

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA




FACULTAD DE INGENIERÍA

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL USO DE BIOMASA
DE LAS DIFERENTES CEPAS DE MICROALGAS DEL ATLANTICO DE
GUATEMALA EN DIFERENTES ÁREAS DE LA INDUSTRIA**

TESIS

View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk

brought to you by  **CORE**

provided by Repositorio Institucional USAC

**PRESENTADA A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE INGENIERÍA
POR:**

LIC. ERICK GIOVANNI ESTRADA PALENCIA
ASESORADO POR EL ING. PABLO CHRISTIAN DE LEÓN

**AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA
DEL MEDIO AMBIENTE**

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2013

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA**



NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA

DECANO Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
VOCAL I Ing. Alfredo Enrique Beber Aceituno
VOCAL II Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco
VOCAL III Ing. Miguel Ángel Dávila
VOCAL IV Br. Juan Carlos Molina Jiménez
VOCAL V Br. Mario Maldonado Muralles
SECRETARIO Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO

DECANO Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
EXAMINADORA Inga. Mayra Virginia Castillo Montes
EXAMINADOR Ing. Cesar Augusto Akú Castillo
EXAMINADOR Ing. Nicolás Guzmán
SECRETARIO Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

Cumpliendo con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi tesis titulada

**"EVALUACION DEL POTENCIAL USO DE BIOMASA
DE LAS DIFERENTES CEPAS DE MICROALGAS DEL ATLANTICO
DE GUATEMALA EN DIFERENTES AREAS DE LA INDUSTRIA"**

tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ingeniería, el 26 de Octubre de 2013



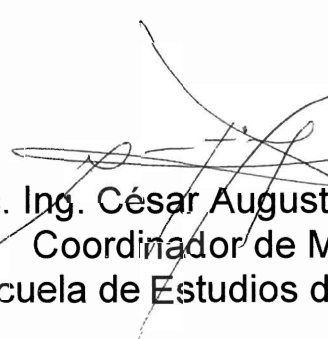
Erick Giovanni Estrada Palencia



Facultad de Ingeniería
Escuela de Estudios
De Postgrado
Teléfono 2418-9142

Como Coordinador de la Maestría en Ciencia y Tecnología del Medio Ambiente, y revisor del Trabajo de Tesis titulado **“EVALUACIÓN DEL POTENCIAL USO DE BIOMASA DE LAS DIFERENTES CEPAS DE MICROALGAS DEL ATLÁNTICO DE GUATEMALA EN DIFERENTES ÁREAS DE LA INDUSTRIAL”**, presentado por el Licenciado Químico **Erick Giovanni Estrada Palencia**, apruebo y recomiendo la autorización del mismo.

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”


MSc. Ing. César Augusto Akú Castillo
Coordinador de Maestría
Escuela de Estudios de Postgrado



Guatemala, noviembre de 2013.

Cc: archivo
/la



Facultad de Ingeniería
Escuela de Estudios
De Postgrado
Teléfono 2418-9142

Como Revisor de la Maestría en Ciencia y Tecnología del Medio Ambiente del Trabajo de Tesis titulado **“EVALUACIÓN DEL POTENCIAL USO DE BIOMASA DE LAS DIFERENTES CEPAS DE MICROALGAS DEL ATLÁNTICO DE GUATEMALA EN DIFERENTES ÁREAS DE LA INDUSTRIAL”**. Presentado por el Licenciado Químico **Erick Giovanni Estrada Palencia**, apruebo el presente y recomiendo la autorización del mismo.

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”


Dra. Mayra Virginia Castillo Montes
Directora
Escuela de Estudios de Postgrado



Guatemala, noviembre de 2013.


Cc: archivo
/la



Facultad de Ingeniería
Escuela de Estudios
De Postgrado
Teléfono 2418-9142

La Directora de la Escuela de Estudios de Postgrado de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer el dictamen y dar el visto bueno del revisor y la aprobación del área de Lingüística del Trabajo de Tesis titulado **“EVALUACIÓN DEL POTENCIAL USO DE BIOMASA DE LAS DIFERENTES CEPAS DE MICROALGAS DEL ATLÁNTICO DE GUATEMALA EN DIFERENTES ÁREAS DE LA INDUSTRIAL”** presentado por el Licenciado Químico **Erick Giovanni Estrada Palencia**, apruebo el presente y recomiendo la autorización del mismo.

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”


Dra. Mayra Virginia Castillo Montes
Directora
Escuela de Estudios de Postgrado



Guatemala, noviembre de 2013.

Cc: archivo
/la



El Decano de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer la aprobación por parte del Director de la Escuela de Postgrado, al Trabajo de Tesis de la Maestría en Ciencia y Tecnología del Medio Ambiente titulado: **“EVALUACIÓN DEL POTENCIAL USO DE BIOMASA DE LAS DIFERENTES CEPAS DE MICROALGAS DEL ATLANTICO DE GUATEMALA EN DIFERENTES ÁREAS DE LA INDUSTRIA”**, presentado por el Licenciado en Química **Erick Giovanni Estrada Palencia**, procede a la autorización para la impresión del mismo.

IMPRÍMASE.



Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
DECANO

Guatemala, noviembre de 2013.

DEDICO ESTE TRABAJO DE TESIS

A Dios, por darme la oportunidad de superar mis metas.

A Maria Jose por ser el pilar de mi vida.

A mi madre santa, por quien soy lo que soy

A mi familia y amigos

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la oportunidad y la fortaleza para alcanzar esta meta.

A María José por creer, confiar y apoyarme siempre

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Escuela de Química, Departamento de Química Orgánica.

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología, personal administrativo y técnico, así como a los investigadores asociados de cada uno de los proyectos que fueron la base de este trabajo de investigación.

INDICE GENERAL

INDICE DE ABREVIATURAS.....	V
INDICE DE FIGURAS	VII
INDICE DE TABLAS.....	IX
RESUMEN	XI
SUMMARY	XIII
OBJETIVOS.....	XVII
HIPOTESIS	XVIII
INTRODUCCION	XIX
1. MARCO TEORICO	1
1.1 Ecosistemas Acuáticos	1
1.2 Algas	1
1.3 Algas microscópicas.....	1
1.4 Descripción de grupos de algas microscópicas	2
1.4.1 Cianobacterias	2
1.4.2 Crisofíceas	2
1.4.3 Euglenofíceas.....	2
1.4.5 Clorofíceas	3
1.4.6 Diatomeas	3
1.4.7 Estudios Realizados en Guatemala	3
1.5 Usos en alimento para humanos y suplementos alimenticios	4
1.6 Usos en alimento para animales	7
1.7 Valor nutricional de las microalgas.....	10
1.7.1 Vitaminas y minerales	10
1.7.2 Pigmentos	10
1.7.3 Ficobiliproteínas	12
1.7.4 Compuestos bioactivos	13
1.7.5 Ácidos grasos.....	14
1.8 Dunaliella salina	15
1.9 Chaetoceros sp	16
1.10 Composición Química de microalgas	18
2. METODOLOGÍA	25
2.1 Materiales.....	26
2.2 Obtención de muestras y trabajo de campo.....	28

2.3	Identificación taxonómica de microalgas.....	29
2.4	Establecimiento de cultivos ex situ de las especies predominantes	29
2.5	Preparación de las soluciones madre	30
2.6	Vitaminas	32
2.7	Medio Plymouth Erdschreiber	32
2.8	Medio f/2 de Guillard	33
2.9	Medio de Suelo y Agua	33
2.10	Inoculación de las soluciones de enriquecimiento.....	34
2.11	Monitoreo y observación de los cultivos.....	34
2.12	Técnicas de aislamiento.....	34
2.12.1	Aislamiento por micromanipulación	34
2.12.2	Aislamiento por dilución	37
2.13	Determinación de Carotenoides por espectrofotometría:	37
2.14	Determinación del contenido de carotenoides totales en biomasa:.....	38
3.	RESULTADOS.....	41
3.1	Area de estudio y puntos de muestreo.....	41
3.2	Inventario de microalgas del Atlántico de Guatemala	41
3.3	Abundancia relativa de microalgas.	44
3.4	Listado de microalgas aisladas e identificadas :	45
3.5	Cantidad de aceite presente en biomasa de microalgas.....	62
3.6	Curva de calibración de Betacaroteno	64
3.7	Determinación de beta caroteno en cepas de microalgas.....	65
3.8	Usos y aplicaciones de la cepas de microalgas del Atlántico.....	66
4.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	67
4.1	Distribución	68
4.2	Análisis de los factores de cultivo de microalgas:	69
4.2.1	Efecto de la luz:.....	69
4.2.2	Efecto de la temperatura:	70
4.2.3	Efecto de los nutrientes:	70
4.2.4	Efecto de la salinidad:	71
4.2.5	El inoculo:.....	72
4.2.6	Fotobioreactores:	72
4.2.7	Medios de cultivo:.....	73
4.2.8	Desarrollo de biomasa:.....	73
4.2.9	Recolección de biomasa:	74
4.2.10	Secado de biomasa:	75
4.3	Uso potencial de las microalgas del Atlántico	76
4.4	Potencial uso de microalgas según resultados experimentales	77
4.4.1	Extracción de aceite:	77
4.4.2	Cuantificación de beta caroteno por espectrofotometría UV-VIS	77

4.5	Potencial uso de microalgas según consulta de literatura.....	78
4.5.1	Botryococcus braunii:	78
4.5.2	Ceratium furca:.....	79
4.5.3	Ceratium fusus:	79
4.5.4	Ceratium trichoceros:	79
4.5.6	Chaetoceros sp:	79
4.5.6	Chlamydomonas reinhardtii:	79
4.5.7	Cloroficea	79
4.5.8	Diatomea verde:	80
4.5.9	Microsystis sp:.....	80
4.5.10	Navicula sp:	80
4.5.11	Nitzschia longissima	80
4.5.12	Odontella aurita:.....	80
4.5.13	Rhizosolenia styliformis:	81
4.5.14	Scenedesmus sp:	81
4.5.15	Thalassionema nitzschioides:	81
4.5.16	Thalassiosira sp:	81
4.6	Biocombustibles:	82
4.7	Acuacultura	82
CONCLUSIONES		83
RECOMENDACIONES		85
REFERENCIAS.....		87
APENDICE.....		93
	Tipos de fotobiorreactores	94

INDICE DE ABREVIATURAS

Símbolo	Significado Ingles/Español
PUFA	Polyunsaturated fatty acids/Ácidos grasos poliinsaturados
EPA	Eicosapentanoic acid/Acido eicosapentanoico
DHA	Docohexaenoic acid/Acido docohexaenoico
GLA	γ -linolenic acid/Acido γ -linolenico
AA	Arachidonic acid/Acido araquidónico
MAA	Mycosporine-like amino acids/Acido amino micosporinico
LDL	Low density lipoprotein/Lipoproteína de baja densidad
LA	Linoleic acid/Acido linolenico
HDLs	High density lipoproteins/Lipoproteínas de alta densidad
DO	Densidad Optica
HL	Horas de Luz diarias
PS	Peso Seco
LO	Ciclo de Luz Oscuridad
MP	Material Particulado

INDICE DE FIGURAS

Figura Descripción

Figura 1	Fotobiorreactor de tubo circular
Figura 2	Fotobiorreactor de pecera plana
Figura 3	Fotobiorreactor de espiral
Figura 4	Fotobiorreactor de tubo vertical
Figura 5	Fotobiorreactor de tubo inclinado
Mapa 1	Area de estudio y puntos de muestreo
Grafico 1	Abundancia relativa de microalgas.
Grafico 2	Curva de calibración de betacaroteno.

INDICE DE TABLAS

Tabla	Descripción
Tabla 1	Aplicaciones biotecnológicas de productos de microalgas
Tabla 2	Grupo, Genero y especies de cepas de microalgas de mayor uso en acuicultura y sus diferentes áreas de aplicación
Tabla 3	Aminoácidos presentes en Dunaliella
Tabla 4	Composición de aminoácidos de Chaetoceros, en % en peso del total de aminoácidos
Tabla 5	Composición química Proteínas, Carbohidratos, Lipidos, Acidos nucleicos de microalgas expresado en % peso seco.
Tabla 6	Contenido de aceite en algunas especies de microalgas
Tabla 7	Comparación de algunas fuentes de materia prima para la elaboración de biocombustibles
Tabla 8	Aplicaciones industriales de algunas microalgas
Tabla 9	Concentraciones de reactivos utilizadas para la preparación de soluciones madre de macronutrientes
Tabla 10	Concentraciones de reactivos utilizadas para la preparación de soluciones madre de micronutrientes.
Tabla 11	Concentraciones de vitaminas utilizadas para la preparación de soluciones madre.
Tabla 12	Volúmenes necesarios de soluciones madre para la preparación del medio de cultivo f/2 de Guillard.

Tabla 13	Inventario de microalgas del Atlántico de Guatemala
Tabla 14	Cantidad de aceite presente en biomasa de microalgas
Tabla 15	Usos y aplicaciones de la cepas de microalgas del Atlantico

RESUMEN

Se realizaron muestreos en diferentes puntos estratégicos ubicados en el litoral Atlántico del país, estos puntos cubren en su mayoría la totalidad del litoral Atlántico de Guatemala, dichas muestras fueron analizadas de manera individual por varios métodos con la intención de identificar las cepas de microalgas presentes en cada punto, cada una de estas cepas después de ser identificadas mediante el uso de claves, fueron sometidas a diferentes técnicas de purificación siendo estas:

Aislamiento por dilución, método que resulto útil para la purificación de cepas de microalgas que formaron hábitos, algunos en forma de largas cadenas las cuales son fácilmente identificables a simple vista, y otros en forma de células individuales que le conferían al medio un color característico. Aislamiento por estriado en caja de Petri, el cual presentó la ventaja que después de varios días de incubación se lograban observar las diferentes colonias de microalgas, 9 de 43 cepas observadas se pudieron aislar y purificar mediante esta técnica. Con la técnica de micromanipulación se lograron aislar 13 de 43, no necesariamente hubo coincidencia en las cepas aisladas con ambas técnicas.

No se logró desarrollar biomasa de todas las cepas identificadas, algunas de las razones se debe a que cada una tiene requerimientos específicos de crecimiento como el grado y periodo de iluminación, concentración de macro y micronutrientes, disponibilidad de dióxido de carbono, aireación, salinidad del medio de cultivo, etc.,. Por lo que para la realización de estudios posteriores se deberán tomar en consideración los factores antes mencionados.

Son varios y diversos los usos y aplicaciones que pueden tener las microalgas, por el número de cepas de microalgas que se identificaron en este trabajo sería imposible realizar la totalidad de los análisis correspondientes de metabolitos

secundarios, principios anti cáncer, caracterización y cuantificación de lípidos y vitaminas, biomoléculas, proteínas, pigmentos, etc,. Por lo que se procedió a aislar mediante diversos métodos las cepas para trabajar cultivos puros y establecer un cepario de microalgas que pudiera estar a disposición de la comunidad científica del país, y se realizaran los estudios correspondientes según los antecedentes que presenta cada microalga de estudios realizados en otros países, y poder así evaluar la viabilidad de desarrollar biomasa a una escala mayor, y diversificar las materias primas de las que actualmente se dispone para el desarrollo de la industria guatemalteca en general.

Con las cepas de microalgas con las que se logró desarrollar una considerable cantidad de biomasa se determinó la cantidad de lípidos presentes, mediante la extracción por solventes, empleando la técnica Soxlet. Con la intención de determinar que cepas de microalgas podrían presentar el potencial adecuado para la elaboración de biocombustibles a partir de procesos de transesterificación. Y se logró cuantificar lípidos en diferentes cepas, así como cuantificar betacaroteno con lo que se confirma por lo menos a una escala menor que si existe el potencial en las cepas de microalgas presentes en el litoral Atlántico de Guatemala.

SUMMARY

Samples were taken at different strategic points located on the Atlantic coast of the country, these points cover most of the entire Atlantic coast of Guatemala , these samples were analyzed individually by several methods intended to identify strains of microalgae present in each point, each of these strains after being identified through the use of keys, were subjected to various purification techniques which are:

Isolation by dilution , it became useful method for purification of microalgal strains that formed habits, some in the form of long chains which are readily identifiable with the naked eye , and others in the form of individual cells that conferred a characteristic color to the medium . Isolation striatum in a Petri dish , which had the advantage that after several days of incubation, colonies were able to observe the different microalgae , 9 of 43 strains observed could be isolated and purified by this technique. With the micromanipulation technique is able to isolate 13 of 43 , did not necessarily match in the isolates with both techniques.

Did not develop biomass identified all strains , some of the reasons is that each has specific requirements for growth and the degree and period of illumination , concentration of macro and micronutrients, availability of carbon dioxide, ventilation , salinity culture medium , etc. . , . So for the further studies should take into consideration the above factors .

There are several different uses and applications that can be algae , by the number of microalgae strains identified in this work would be impossible for all corresponding analyzes of secondary metabolites , anti cancer early , characterization and quantification of lipids and vitamins, biomolecules , proteins, pigments , etc. . So we proceeded to isolate strains using various methods to work and establish pure cultures of microalgae culture collection that

could be available to the scientific community of the country, and corresponding studies be conducted based on the evidence presented by each microalgae from studies in other countries, and thus be able to assess the feasibility of developing biomass on a larger scale , and diversification of raw materials currently available for the development of the Guatemalan industry in general.

With microalgae strains which failed to develop a considerable quantity of biomass was determined by the amount of lipid present , by solvent extraction using Soxhlet technique . In order to determine which strains of microalgae can provide adequate potential for the production of biofuel from transesterification processes . And he managed to quantify lipids in different strains , as well as beta-carotene to quantify what is confirmed at least on a smaller scale if there is potential of microalgae strains present in the Atlantic coast of Guatemala .

DEFINICION DEL PROBLEMA

En Guatemala no se tiene registro de investigación exhaustiva respecto a microalgas, son muy escasas las entidades que reportan estudios al respecto. ¿Cuál es el potencial de las microalgas como materia prima y recursos biológicos que no son aprovechados en las distintas áreas de la industria? En este estudio se aprovecharon estudios previos realizados por la Universidad de San Carlos de Guatemala con el financiamiento del Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología, para evaluar el potencial uso de cepas de microalgas aisladas del Atlántico del país. Obteniendo resultados positivos respecto del uso y aplicaciones que se les puede dar a las cepas estudiadas.

¿Es posible conocer el número de cepas de microalgas que se encuentran presentes en un área como lo es, el Litoral del Atlántico del país?. Definitivamente si, mediante muestreos programados de forma representativa se logró colectar suficiente cantidad de biomasa y se lograron aislar un considerable numero de cepas.

¿Es posible aislar, purificar e identificar las cepas de microalgas presentes en los muestreos del Atlántico del país? Se emplearon métodos diversos para aislar y purificar las cepas de microalgas, entre ellas la micromanipulación, dilución y estriado en caja de petrí, obteniendo resultados positivos.

¿Presentan las cepas de microalgas del Litoral Atlántico el potencial necesario para su investigación, desarrollo y explotación? De las cepas aisladas y purificadas se encontró que algunas de las cepas tienen aplicaciones en alimentos, biocombustibles, colorantes, biopolímeros, fármacos, fertilizantes, entre otros.

Con los resultados obtenidos de la cantidad de lípidos y compuestos carotenoides y la consulta de diferentes fuentes bibliográficas se puede afirmar que la información recopilada constituye una valiosa fuente de información de referencia respecto del uso de las microalgas, con lo que se responde a la pregunta ¿Provee la base de datos información confiable relacionada con microalgas necesaria para fomentar su explotación industrial?

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluación del potencial uso de biomasa de las diferentes cepas de microalgas del Atlántico de Guatemala en diferentes áreas de la industria

Objetivos Específicos

1. Muestrear en el litoral Atlántico del país para evaluar que tipo de cepas de microalgas se encuentran presentes.
2. Aislar las cepas de microalgas empleando técnicas de aislamiento por micromanipulación, dilución y estriado en caja de Petri.
3. Purificar los cultivos de microalgas para garantizar que ningún otro microorganismo se encuentra presente al momento de realizar los análisis específicos respectivos.
4. Identificar las diferentes microalgas empleando claves internacionales y utilizando fotografías de cada una de las cepas aisladas.
5. Crear una base de datos confiable respecto de la biodiversidad de microalgas presentes en el Atlántico del país y su potencial uso en diferentes áreas de la industria en general.

HIPOTESIS

Las cepas de microalgas que se encuentran presentes en el Atlántico del país podrían presentar alguna aplicación en la industria, lo que representaría un recurso alternativo para su respectiva explotación.

INTRODUCCION

El presente trabajo presento como objetivo realizar un muestreo en el litoral Atlántico de Guatemala, con la intención de determinar las diferentes cepas de microalgas que se encuentran presentes a lo largo del mismo, desde la frontera de Guatemala con Belice y terminando el recorrido con la frontera con Honduras. Se realizó una colecta de muestras con una red de plancton en diferentes puntos de muestreo, los cuales se eligieron estratégicamente para obtener un resultado representativo.

Todos los puntos que se eligieron fueron marcados en un mapa e identificados colocando las coordenadas registradas en el GPS. Posteriormente, se evaluó cada una de las muestras obtenidas y se procedió a aislar y purificar cada una de las diferentes cepas identificadas, y se creo un cepario de microalgas.

Se realizaron dos tipos de muestreos, uno de los cuales se fijó con la intención de poder identificar todas las cepas que están presentes en cada muestra al momento de tomar la misma, esto se hace porque a pesar de que se utilizará una red especial para fitoplancton, algunos ejemplares de zooplancton pasarán a través de la red, lo que después de unas horas podría reflejar resultados diferentes en cuanto a la diversidad de microalgas presentes en la muestra debido a que el fitoplancton es la principal fuente de alimento del zooplancton.

Una vez establecido el cepario se procedió a realizar una revisión de la literatura, la cual incluye características particulares de cada cepa, esto con la ayuda de claves internacionales preferentemente del área del Atlántico como por ejemplo de la Costa de EEUU, México, Cuba y Costa Rica que son los países que mas registro tienen al respecto.

Con las cepas de microalgas se procedió a inocular las mismas en medios de cultivo a mayor escala, se diseñaron varios fotobiorreactores en los que se desarrollará suficiente cantidad de biomasa para hacer las pruebas de cuantificación de aceites, los fotobiorreactores se diseñaron con materiales como el vidrio o plástico transparente para que de esta manera pudieran ser expuestos los medios y las microalgas a una fuente de luz natural, para el caso de las fuentes de luz artificial se utilizaron lámparas de luz fría blanca, a las que se les acopló un regulador de tiempo que controló los fotoperiodos a los que las cepas fueron expuestas.

Diariamente se monitorearon los tubos de ensayo, cajas de Petri, frascos de vidrio y fotobiorreactores con la intención de evaluar el grado de desarrollo de biomasa generado diariamente. Se realizaron conteos de microalgas por medio de cámara de Neubauer (análogo al conteo de glóbulos blancos en sangre) para tener una idea del desarrollo celular. También se emplearon métodos espectrométricos UV VIS con la misma intención.

Con la biomasa obtenida se realizaron extracciones de lípidos (aceites) para calcular los porcentajes de rendimiento en cada una de ellas y en función de estos resultados evaluar el potencial uso de esta fuente de materia prima para la elaboración de biocombustibles como el biodiesel.

Una vez se estableció la totalidad de microalgas presentes en las muestras se realizó una compilación de los usos y aplicaciones que están registrados para cada una. Con la intención de inspirar, incentivar y promover un mayor número de investigaciones relacionadas con la explotación de este recurso, debido a que conociendo la riqueza, abundancia y utilidades que se les puede dar a las microalgas, se podrá en un futuro tecnificar el cultivo y desarrollar estas cepas para aprovechar de mejor manera la riqueza de nuestra biodiversidad en el Atlántico del país.

El tema de las microalgas en la actualidad ofrece muchas incógnitas, debido a que no se terminan de estudiar en la actualidad las diferentes cepas en profundidad, es un campo aun fértil en información y de explotación por lo que se hace necesario fomentar su estudio con la intención de generar más posibilidades o alternativas alimenticias, farmacológicas y energéticas. Así como otras que puedan en un momento complementar las que en la actualidad se utilizan.

1. MARCO TEORICO

1.1 Ecosistemas Acuáticos

Son sistemas acuáticos que se caracterizan por tener áreas de pantano, ciénaga o agua; estancada o con corrientes; dulce, salobre o salada en donde interactúan comunidades bióticas entre si y son el suelo, el aire el agua y la luz. Esos constituyen espacios ricos en biodiversidad especialmente en latitudes altas como la de Guatemala, en donde la temperatura ambiental y la luz entre otros factores favorecen la diversificación de organismos. Los ecosistemas acuáticos se definen de muchas formas, una de ellas es el gradiente de salinidad del agua, aspecto que junto a otros define a las comunidades que interactúan en el medio. De acuerdo con el gradiente de salinidad las comunidades se pueden dividir en ecosistemas de agua dulce y ecosistemas de agua salobre y marina (CONAP, 2008).

1.2 Algas

Las algas son protistas, unicelulares o pluricelulares, fotosintéticos, que carecen de tejidos. Las algas microscópicas son en su mayoría unicelulares, viven en medios acuáticos. Realizan la mayor parte de la fotosíntesis de la tierra, siendo el primer eslabón de las cadenas tróficas de los ecosistemas acuáticos, liberan grandes cantidades de oxígeno a la atmósfera.

1.3 Algas microscópicas

Las algas microscópicas son las formas más primitivas de plantas. Durante el procesos de fotosíntesis en microalgas es similar al de las plantas superiores, estas son los más eficientes convertidores de energía solar debido a su estructura celular sencilla, lo cual, sumado a tener mayor acceso a CO₂ y nutrientes por estar suspendidas en el agua. Dentro de estas se encuentran las

euglenófitas, las diatomeas, los dinoflagelados, haptofitas, crisofitas y cianobacterias, siendo las únicas procariotas dentro del grupo de las algas.

1.4 Descripción de grupos de algas microscópicas

1.4.1 Cianobacterias

Se encuentra dentro del grupo de las Cyanophyta, son procariotas coloniales o filamentosas, carecen de cloroplastos, los pigmentos se encuentran distribuidos a través del protoplasto y contenidos en los tilacoides, poseen clorofila a, tres carotenoides, xantofilas, ficoeritrina, ficocianina, delgadas paredes celulares o una membrana gelatinosa, falsas vacuolas, que refractan la luz oscureciendo el verdadero color de las células. Carecen de un núcleo, el material se encuentra genético se encuentra acumulado. Se reproducen por medio de fisión binaria o por esporas y almacenan su alimento en gránulos de almidón y algunas en almidón de florídeo. Un género bastante estudiado es *Spirulina*, por sus propiedades antioxidantes y en la industria de los alimentos (Prescott, sf).

1.4.2 Crisofíceas

Se encuentra dentro del grupo de las Chrysophyta. Algunas veces son coloniales y pocas veces filamentosas. Poseen tres clorofilas, tres carotenoides de siete a dieciséis xantofilas, no necesariamente presentes en todos los organismos, como pigmentos los cuales están contenidos dentro de los cloroplastos. Almacenan su alimento en forma de aceite, y crisolaminarina dándole a la célula un brillo metálico. Poseen una pared relativamente gruesa, regularmente silicificada o con escamas de sílice. Dentro de estas se puede mencionar al género *Emiliania* pues poseen documentación fósil, a causa de sus escamas calcificadas (Prescott, sf).

1.4.3 Euglenofíceas

Se encuentra dentro del grupo de las Euglenophyta, son células solitarias, gregarias en una sola familia, poseen de uno a tres flagelos, sus pigmentos son

clorofila a, clorofila b, cuatro carotenoides, xantofilas y con pirenoides usualmente presentes, almacenan alimento en barras de paramilo, su núcleo es largo y está situado al centro de la célula, la membrana celular es una película rígida frecuentemente estriada. Son muy utilizadas como bioindicadores pues su presencia es común en lugares con altas concentraciones de materia orgánica (Prescott, sf).

1.4.5 Clorofíceas

Se encuentran dentro del grupo de las Chlorophyta, pueden ser coloniales, unicelulares o filamentosas, contienen cloroplastos con pigmentos de clorofila a, clorofila b, dos o tres carotenoides, de seis a diez xantofilas, a pesar de ser pequeño e inconspicuo poseen un núcleo definido y pared celular de celulosa y pectosa. *Dunaliella salina* es una especie de microalga halófila que se conoce por su actividad antioxidante, y es usada en cosméticos y en suplementos nutricionales (Prescott, sf).

1.4.6 Diatomeas

Pertenecen al Phylum Bacillariophyta. Pueden encontrarse en aguas dulces o marinas, su pared celular está formada de sílice (frústula), poseen clorofila a y c diatoxantina, fucoxantina, almacenan su alimento en forma de crisolaminarina. Entre estas se puede mencionar *Chaetoceros muelleri* que presenta actividad antimicrobiana (Prescott, sf).

1.4.7 Estudios Realizados en Guatemala

Se cuentan con investigaciones que incluyen el estudio de microalgas, donde forman parte de investigación secundaria del proyecto, por tal razón, documentos como “Biodiversidad de Guatemala” y “Guatemala y su Biodiversidad” comenta que no existen estudios reportados para Guatemala. Como única fuente el CONAP menciona el estudio de Fonseca y Arrivillaga (2003). Algunos pocos estudios están enfocados directamente a microalgas

como el proyecto FODECYT 43-2007, que investiga las microalgas para evaluar la cantidad de aceites fijos presentes, y utilizar dichos aceites como materia prima para la elaboración de biodiesel, el proyecto FODECYT 3-2009, que trata de desarrollar suficiente cantidad de biomasa para la extracción de aceites fijos a escala de planta piloto, generando información referente al número de especies identificadas en el Atlántico del país y constituyendo un cepario parcial de microalgas. Además, la Universidad del Valle de Guatemala realizó un estudio en el que se determinaba la toxicidad del agua por medio del estudio de alga verde unicelular *Selenastrum capricornutum* (Mayorga, sf).

1.5 Usos en alimento para humanos y suplementos alimenticios

Algunas de las microalgas son consumidas como alimento con un alto valor nutricional. De hecho la espirulina a sido consumida desde tiempos inmemorables por nativos de México y Chad (África). En México la *Espirulina* es colectada de el lago Texcoco y se consume como un pastes seco llamado tecuitlatl. En Chad la Espirulina es extraída de el lago alcalino Kossorom para la preparación de un pastel seco que ellos llaman “dihe”. Actualmente la Espirulina contribuye significativamente a la economía de Chad ya que la venta local del “dihe” aporta mas de \$100,000 dólares Americanos.

En la actualidad la Espirulina constituye la materia prima para la producción y comercialización de biomasa como suplemento alimentario en países como Tailandia, China, Estados Unidos e India. Se estima que la producción total mundial de Espirulina esta en el rango de 3,000 a 4,000 toneladas métricas. La Espirulina es reconocida por su alto valor nutricional tanto por el alto contenido de proteínas, acido linolenico, vitaminas y minerales. Adicionalmente a su uso como producto alimenticio, La Espirulina es conocida por tener implicaciones terapéuticas, incluyendo actividad anticancer, control de la diabetes, artritis, anemia y enfermedades cardiovasculares. La Espirulina también es empleada como ingrediente funcional el cual es incorporado en varios alimentos para

enriquecer sus propiedades alimenticias y como suplemento para el control de desordenes crónicos como la diabetes hipertensión y enfermedades del corazón. Se sabe que la Espirulina también actúa como antioxidante ya que contiene compuestos como la ficocianina y vitamina E.

Otra cianobacteria también a sido consumida como alimento desde hace 2,000 años en la China, se trata de Nostoc. El alga es reconocida como alimento saludable así como por tener altos contenidos proteína y pigmentos, así como un alto contenido de grasas. Nostoc flageliforme contiene grandes cantidades de pigmentos como equinona y mixoxantofilas, así como alifococianina, picocianina y clorofila. Además contiene 19 aminoácidos de los cuales 8 son esenciales para la nutrición humana, constituyendo arriba del 35.8-38% del total de aminoácidos. Esta alga a sido utilizada como medicamento tradicional de la China desde hace 400 años atrás, para el tratamiento de diarrea, hipertensión, y hepatitis. Otras especies como Nostoc sphaeroides o localmente llamada Ge-Xian-Mi es colectada en ciertas regiones de la China para su uso en alimentos.

Chlorella es otra alga que a sido usada masiva y comercialmente para la producción de alimentos saludables en presentación de polvo o pastillas. La primer planta piloto de producción de biomasa se estableció en Boston Estados Unidos, y fue seguida por otras plantas de cultivo en Israel, Japón y Checoslovaquia. En Taiwán existen 70 compañías produciendo Chlorella, y las ventas anuales de Chlorella superan los \$38 billones de dólares. El valor nutricional de la Chlorella se debe a su alto contenido de proteínas (51-58% en peso seco) y carotenoides, con un alto rango de vitaminas. Además el alga contiene beta glucano, que es un inmunoestimulador, y tiene otros efectos benéficos en la erradicación de radicales libres además de reducir los lípidos en la sangre.

Tabla 1: Aplicaciones biotecnológicas de productos de microalgas

Microalga	Molécula de interés	Usos y aplicaciones
Acidos grasos poliinsaturados		
Pavlova, Nannochloropsis, Monodus y Phaeodactylum	Acido eicosapentanoico (EPA)	Suplemento nutricional y alimento en acuicultura
Cryptocodinium y Schizochytrium	Acido docohexanoico (DHA)	Formula infantil, suplemento nutricional, alimento en acuicultura
Spirulina	Acido γ -linolenico (GLA)	Suplemento nutricional
Porphyridium	Acido araquidónico (AA)	Suplemento nutricional
Ficobiliproteinas		
Spirulina platensis	Ficocianina	Colorante natural de alimentos saludables y cosméticos (pintalabios y delineadores de ojos) antioxidante
Porphyridium cruentum	picoeritrina	Agente fluorescente, herramienta para la investigación biomédica, herramienta de diagnostico
Carotenoides		
Dunaliella Salina	β -caroteno	Colorante alimenticio, antioxidante, propiedades de prevención de cáncer
Haematococcus pluvialis	Astaxantina	Pigmento de salmon, antioxidante

Aphanizomenon flos-aquae	Micosporina de aminoácido (MAA)	Filtro solar, protector solar
Porphyridium cruentum	Polisacáridos	Viscosificadores, lubricantes y floclulantes para aplicaciones industriales, agente antiviral
Dinoflagelados como: Amphidinium, Prorocentrum y dinophysis	Picotoxinas, ácido ocaico, goniatoxinas y yesotoxinas	Herramienta experimental para investigaciones por muerte neurodegenerativa
Chlorella protothecoides y Botryococcus braunii	Lípidos triglicéridos e hidrocarburos	Biocombustibles

Fuente: FAO Lavens P Sorgeloos P 1996 Manual on the production and use of live food for aquaculture.

1.6 Usos en alimento para animales

Las microalgas proveen una importante fuente de alimento de forma directa o indirecta para las etapas iniciales de crecimiento de peces criados en granjas, mariscos, y especies de invertebrados. Los criaderos de peces dada la demanda comercial actual cultivan las microalgas en sus propias granjas mas comúnmente. Diferentes cepas de macro y microalgas resultan muy eficientes en la formulación de alimentos para animales, existe suficiente evidencia científica que respalda la evidencia de buenas propiedades nutricionales que promueven la producción de biomasa de microalgas como fuente de micronutrientes a una escala industrial. Los elevados costos de la biomasa de microalgas, comparada con los precios de los alimentos comerciales condicionan su uso para alimentos en limitadas aplicaciones, aunque su gran disponibilidad, el bajo costo, y su uso como biocombustibles podrían ampliar un mayor uso en el futuro.

Se cuenta con una vasta cantidad de literatura disponible respecto del uso de algas en acuicultura, técnicas de cultivo, métodos de entrega y modos de operación. Investigaciones recientes predicen el excelente potencial de la biomasa de microalgas como piensos a granel formulados para alimento en acuicultura, el futuro comercial y la viabilidad de esto va a depender de la cantidad disponible, de la calidad (en cuanto a su composición) y el costo en relación con los materiales de uso común que se utilizan actualmente.

Como participan las microalgas en la acuicultura:

1. Todas las etapas de desarrollo de los moluscos bivalvos son directamente dependientes de las microalgas como fuente de alimentación.
2. Los moluscos como el abulón, y erizos de mar requieren una dieta de diatomeas bentónicas previo a la transición a su dieta juvenil de macroalgas.
3. Las etapas larvales de crustáceos de importancia comercial (camarones) se introducen en microalgas seguido de una alimentación con zooplancton.
4. Las pequeñas larvas de especies de peces marinos y algunos de agua dulce se desarrolla en sus estadios iniciales en tanques de “agua verde” rica en microalgas.
5. El zooplancton es una fuente de alimentación de etapas maduras de desarrollo de moluscos, crustáceos y peces, los cuales también son alimentados con microalgas, convirtiendo a estas ultimas en la base de la cadena alimentaria.

Tabla No. 2: Grupo, Genero y especies de cepas de microalgas de mayor uso en acuicultura y sus diferentes áreas de aplicación

Grupo	Genero	Especie	Área de aplicación
Cyanobacteria	Arthrospira	platensis	IFA
Chlorophyta	Tetraselmis	Suecica, chui	B, LC
	Chlorella	Sp, vulgaris, minutissima, virginica, grossi	R, IFA
	Dunaliella	Sp, tertiolecta, salina	IFA
	Haematococcus	pluvialis	IFA
Eustigmatophyceae (Phylum Heterokontophyta)	Nannochloropsis	Sp, oculata	R, AV
Labyrinthulea (Phylum Heterokonta)	Schizochytrium	sp	RA
	Ulkenia	sp	RA
Bacillariophyta (diatomeas)	Chaetoceros	Calcitrans, gracilis	B, LC
	Skeletonema	costatum	B, LC

	Thalassiosira	pseudonana	B, LC
	Nitzschia	sp	GME
	Navicula	Sp	GME
	Amphora	Sp	GME
Haptophyta	Pavlova	Lutheri	B
	Isochrysis	Galbana, tahiti	B, AV
Dinophyta (dinoflagelados)	Cryptothecodinium	Cohnii	RAS

Fuente: Artículo de algas como alimento animal en acuicultura, Robin J. Shieds e Ingrid Lupatsch, de la Universidad de Swansea, Reino Unido

CLAVE: IFA Ingredientes formula de alimentos, B bivalvos moluscos, C crustáceos larvarios (camarones, langostas), R rotíferos, RAS rotíferos y artemia como presas vivas (producto en forma seca) GME gastropodos moluscos y erizos de mar, AV “agua verde” para larvas de peces, AV “agua verde” para larvas de peces.

1.7 Valor nutricional de las microalgas

1.7.1 Vitaminas y minerales

El contenido de vitaminas en biomasa de microalgas puede variar significativamente dependiendo de la especie. El ácido ascórbico es un ejemplo a considerar.

1.7.2 Pigmentos

Los carotenoides son pigmentos que pueden ser amarillos, naranjas o rojos que se encuentran de forma natural y los mismos están distribuidos en diferentes

formas vivas. Los mismos son pigmentos empleados en la fotosíntesis, y ellos son derivados de unidades de isopreno de 5 carbonos los cuales son polimerizados enzimáticamente para formar estructuras conjugadas de 40 carbonos. Estos compuestos carotenoides consisten únicamente en hidrocarburos. Mientras que las que contienen grupos oxo, hidroxilo o grupos epoxi son llamados xantofilas.

Los principales carotenoides que tienen mayor uso comercial son: beta carotenos y axtaxantinas, y un poco menos la lluteina, zeaxantina y licopeno. Los carotenoides son empleados como colorantes naturales en alimentos y como aditivos en piensos para animales, además de su uso en cosméticos. En términos de relevancia nutricional, vale la pena mencionar que el beta caroteno esta relacionado con la provitamina A. Los carotenoides se caracterizan por poseer valor terapéutico, incluyendo actividad antiinflamatoria y anti cáncer.

Otro carotenoide de microalgas que tiene aplicación comercial es la astaxantina. Este pigmento es un cetocarotenoide el cual es producido por el alga verde ***Haematococcus pluvialis***. Este carotenoide principalmente se utiliza como colorante de alimentos, se incluye como suplemento nutritivo en salmón y camarón. El mercado de este carotenoide genera anualmente ventas por \$200 dólares americanos con un precio promedio de \$2,500 por kilogramo.

Recientemente la astaxantina se vende en presentación de capsulas como nutraceutico para humanos. Ya que presenta una fuerte actividad antioxidante 100 veces mas que el alfa tocoferol. Estudios muestran que la astaxantina tiene efectos ayudan a prevenir enfermedades como algunos tipos de cáncer, diabetes, nefropatía diabética, síndrome metabólico, enfermedades neurodegenerativas.

Solamente los microorganismos, hongos, algas y plantas pueden sintetizar carotenoides, los demás animales deben incluir en sus dietas estos pigmentos,

transfiriéndolos en la cadena alimenticia. La crianza de salmones requiere un suministro de astaxantina que le confiere el cono rosado al filete. Carotenoides sintéticos son empleados para este propósito comercial en acuicultura. Además derivados de algas contienen carotenoides que le imparten esta coloración eficientemente. Por ejemplo la astaxantina obtenida de ***Haematococcus plusvialis*** a sido aprobada como aditivo de color. ***Chlorella sp*** y ***Spirulina sp*** son comúnmente incorporadas en los alimentos de peces ornamentales, cuando la coloración y apariencia saludable es el principal criterio comercial.

Para pigmentación de yemas de huevo y pollos de engorde, se formulan alimentos tradicionalmente conteniendo alfalfa o maíz, ambos contienen luteína y zeaxantina. Se reporta que alimentando a las gallinas con biomasa de algas se incrementa la pigmentación de la yema del huevo incluyendo un 15% de ***Chlorella vulgaris*** (Strand y colaboradores 1998) también se reporta un buen potencial de ***H. Pluvialis*** como pigmento natural en pollos rostizados.

1.7.3 Ficobiliproteínas

Las ficobiliproteínas son pigmentos fotosintéticos hidrosolubles que se encuentran en algas como cianobacterias, rodofitas (algas rojas), criptofitas y glaucofitas. Estas son las tres mayores ficobiliproteínas llamadas ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina, las cuales difieren en sus propiedades espectrales. El contenido de ficobiliproteínas en las microalgas varía según las condiciones climáticas en las que se desarrolla, especialmente la intensidad y la calidad del espectro de luz. Por ejemplo, la ***Espirulina platensis*** contiene de 0.11 a 12.7% en peso seco de ficobiliproteínas. Dos de las microalgas que son explotadas para la extracción de ficobiliproteínas son la *Espirulina* y *Porfiridium*. La mayor aplicación de estos pigmentos es como colorantes alimenticios naturales y productos cosméticos, también como marcadores fluorescentes biomédicos en investigación diagnóstica. Existe un producto comercial que se llama Lina Blue que es utilizado en goma de mascar, helados, paletas, dulces, refrescos. Otra

forma de este pigmento es utilizado en cosméticos como pintalabios y delineador de ojos. El precio de las ficobiliproteínas puede variar entre \$3 a \$1500 por miligramo. Recientes estudios muestran que las ficocianinas tienen propiedades que promueven la salud y son utilizadas en gran cantidad de aplicaciones farmacéuticas. El poder antioxidante de las ficocianinas es 16 veces más eficiente que trolox (análogo de la vitamina E) y 20 veces más efectivo que la vitamina C.

1.7.4 Compuestos bioactivos

Las microalgas poseen una gran cantidad de estrategias fisiológicas, bioquímicas y moleculares para lidiar con el estrés, son capaces de sintetizar una gran variedad de químicos bioactivos. Estos compuestos bioactivos generalmente son metabolitos secundarios, que incluyen varios tipos de sustancias como ácidos orgánicos, sustancias de crecimiento, carbohidratos, antibióticos, enzimas y compuestos tóxicos. Los metabolitos muestran gran variedad de actividades biológicas, incluyendo actividad anti cáncer, antiviral, antioxidante y efectos inmunomodulatorios. De todos los tipos de microalgas las cianobacterias presentan mayores promesas de contener compuestos bioactivos.

Los metabolitos tóxicos de la microalga (ficotoxinas) son grupos prometedores para la explotación biotecnológica de moléculas bioactivas. La explosión en el crecimiento de estas microalgas puede influir fuertemente en la eutrofización de lagos especialmente cuando los niveles de nitrógeno y fósforo están en exceso. Se tiene registro de por lo menos 300 especies de microalgas que producen crecimientos descontrolados, por lo menos 4 de estas especies producen toxinas. Las toxinas pueden producir daños en la salud de los humanos, animales domésticos y vida salvaje con efectos toxicológicos incluyendo neurotoxicidad, hepatotoxicidad, citotoxicidad y dermatotoxicidad. Las toxinas más comunes en algas de agua dulce son microcistis, homo y anatoxina y

saxitoxinas, las cuales son producidas por cianobacterias como ***Microsistis***, ***Anabaena oscillatoria*** y especies ***Nostoc***.

Las ficotoxinas muestran un amplio rango de actividades biológicas incluyendo citotóxicas, antitumoral, antibiótica, antifúngica, inmunosupresoras y actividades neurotóxicas, lo que ofrece un gran potencial para la explotación biotecnológica.

Las microalgas también presentan el potencial de poseer compuestos antivirales que aun no están del todo explorados. Por ejemplo extractos de cianobacterias mostraron un promedio del 10% de inhibición por infección celular de HIV-1 y HSV-2. La cianovirina-N mostro actividad antiviral contra el VIH. El polisacárido espirulinato sulfatado de calcio mostro actividad antiviral para inhibir el crecimiento de virus del Herpes simple. El polisacárido sulfatado del alga roja ***Porfiridium*** también mostro actividad antiviral frente a HSV-1, HSV-2 y varicela zoster previniendo la absorción de viriones.

Moléculas bioactivas con actividad anti cáncer son de los mayores grupos estudiados en microalgas. Un aproximado de 1000 extractos de cianobacterias aislados de varios ambientes fueron estudiados. Los derivados poliacetilados de macrolitos citoficinas fueron aislados de ***Scytonema pseudohofmanni*** presentan inhibición de gran variedad de células mamarias, incluyendo células cancerígenas de la epidermis.

1.7.5 Ácidos grasos

Algunas de las microalgas tienen el potencial de sintetizar ácidos grasos de cadena larga poliinsaturada (LC-PUFA) especialmente ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), los cuales están relacionados en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. La fuente tradicional de LC-PUFA es el aceite de pescado, el cual es adquirido por el pez en función de la dieta que tenga, que consiste en microalgas marinas.

En humanos el DHA es importante para el adecuado funcionamiento del cerebro y ojos en niños y muestra propiedades de beneficios en la salud cardiovascular en adultos. Una de las microalgas que registra una mayor concentración de aceite rico en DHA es ***Crypthecodinium cohnii*** la cual contiene 40 – 50% DHA. La mayor aplicación de el aceite de DHA es en la formulación de la leche para bebés. También se emplea en formulaciones de suplementos alimenticios de adultos en alimentos y bebidas, además de comida para embarazadas.

La crianza de peces ofrece fuentes ricas en cadenas largas e insaturadas de ácidos grasos, estos ácidos grasos son cruciales en la salud del ser humano y juegan un importante rol en la prevención y tratamiento de daños coronarios del corazón, hipertensión, diabetes, artritis y otros desordenes inflamatorios y autoinmunes. Debido a la falta de aceite de pescado, investigadores han encontrado como alternativa fuente de lípidos a la biomasa de microalgas. Las microalgas a diferencia de cultivos terrestres, produce estos ácidos grasos como el ácido araquidónico (***Porphyrium***) ácido eicosapentanoico (***Nannochloropsis*, *Phaeodactylum*, *Nitzschia*, *Isochrysis*, *Diacromea***) y ácido docasahexaenoico (***crypthecodinium*, *schizochytrium***).

1.8 *Dunaliella salina*

La composición química va variar y a depender de las condiciones de cultivo, pero en general se puede decir que contiene:

- Hidrocarburos: Hasta un 70% en peso seco de mono, di y polisacáridos. También se destaca la acumulación de glicerol.
- Lípidos: Este contenido puede variar entre 6 y 15% en función de la salinidad del medio de cultivo. Los principales componentes de la fracción lipídica son los isómeros del B-caroteno, mono y digalactosilglicerol.

- Proteínas: Hasta un 50% en peso seco, al aumentar la concentración de sal disminuye la de proteínas hasta un 30%.

Tabla 3: Aminoácidos presentes en Dunaliella

Aminoácido	g/100 g de proteína
Alanina	6.3 – 12.9
Arginina	0.9 – 5.2
Ac. Aspártico	2.5 – 10.7
Cisteína	trazas
Ac. Glutámico	7.9 – 11.9
Glicina	9.5 – 13.3
Histidina	1.2 – 8.8
Isoleucina	2.3 – 4.2
Leucina	5.0 – 17.6
Lisina	4.8 – 33.9
Metionina	Trazas
Fenilalanina	1.4 – 5.4
Prolina	4.2 – 8.8
Serina	6.3 – 8.6
Treonina	2.5 – 6.0
Triptofano	ND
Tirosina	Trazas – 1.9
Valina	3.6 – 5.8

Fuente: Brown Et al 1991

Dunaliella es una de las microalgas que presenta una mayor concentración de β -caroteno. Hasta un 14% en peso seco.

1.9 Chaetoceros sp

Probablemente sea la microalga mas empleada en las granjas de acuicultura de crustáceos debido a su completo perfil lipídico. Especialmente se emplea en la alimentación de la fase larvaria.

Las características nutricionales de ***Chaetoceros*** son: Hidrocarburos: 5% de contenido en hidratos de carbono, con un 88% en forma de polisacáridos. Siendo la glucosa el monosacárido mayoritario 60%.

Proteínas: Posee un 35% en peso seco de proteínas. Siendo la leucina y fenilalanina sus principales aminoácidos, además del ácido glutámico 10%.

Pigmentos: clorofila a es el principal pigmento alrededor de un 3% en peso seco.

Lípidos: aproximadamente 16% principalmente compuestos triglicéridos, 6% ácidos libres, 27% ácidos grasos monoinsaturados, 39% ácidos grasos poliinsaturados. Y cantidades traza de colesterol.

Tabla 4: Composición de aminoácidos de *Chaetoceros*, en % en peso del total de aminoácidos

Aminoácido	g/100 g de proteína
Arginina	7.0
Histidina	2.5
Isoleucina	7.6
Lisina	5.4
Metionina	2.5
Fenilalanina	7.5
Prolina	6.7
Treonina	6.3
Triptofano	1.7
Valina	6.6
Alanina	7.3
Acido aspártico	8.5
Cisteina	0.6
Acido Glutámico	10.0
Glicina	5.4
Hidroxi-prolina	0.4

Ornitina	0.4
Serina	7.0
Tirosina	5.7
Acido 3-aminobutirico	0.8

Fuente: Brown Et al 1991

1.10 Composición Química de microalgas

Tabla 5: Composición química Proteínas, Carbohidratos, Lípidos, Ácidos nucleicos de microalgas expresado en % peso seco.

Microalga	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos	Ácidos nucleicos
<u>Scenedesmus obliquus</u>	50-56	10-17	12-14	3-6
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	1.9	-
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40	-
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21	-
<u>Chlorella vulgaris</u>	51-58	12-17	14-22	4-5
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2	-
<i>Spirogyra sp.</i>	6-20	33-64	11-21	-
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8	-
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6	-
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20	-
<i>Prymnesium parvum</i>	28-45	25-33	22-38	1-2
<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3	-
<u>Porphyridium cruentum</u>	28-39	40-57	9-14	-
<u>Spirulina platensis</u>	46-63	8-14	4--9	2-5
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7	3-4.5
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11	5
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7	-

Fuente: Becker (1994)

Tabla 6: Contenido de aceite en algunas especies de microalgas

Espece de microalgas	% peso
Ankistrodesmus TR-87	28-40
Botryococcus braunii	29-75
Chlorella sp.	29
Chlorella protothecoides (autotrophic/ heterothrophic)	15-55
Cyclotella DI- 35	42
Dunaliella tertiolecta	36-42
Hantzschia DI-160	66
Nannochloris	31(6-63)
Nannochloropsis	46(31-68)
Nitzschia TR-114	28-50
Phaeodactylum tricornutum	31
Scenedesmus TR-84	45
Stichococcus	33(9-59)
Tetraselmis suecica	15-32
Thalassiosira pseudonana	(21-31)
Crptheodinium cohnii	20
Neochloris oleoabundans	35-54
Schiochytrium	50-77

Fuente: sitio oilgae.com

Tabla 7: Comparación de algunas fuentes de materia prima para la elaboración de biocombustibles

Cultivo	Rendimiento en aceite (L/Ha.año)	Area de cultivo requerida (Mha)	Porcentaje del área cultivable
Maíz	172	1540	846
Soya	446	594	326
Colza	1190	223	122
Jatropha	1892	140	77
Coco	2689	99	54
Palma	5950	45	24
Microalgas (70% PS)	136900	2	1.1

Fuente: Chisti, Y (2007)

Tabla 8: Aplicaciones industriales de algunas microalgas

Microalga	Uso	bibliografia
Euglena gracilis	Tratamiento de aguas residuales	Ahmed H, Häder DP (2011) Monitoring of waste water samples using the ECOTOX biosystem and the flagellate alga Euglena gracilis. Water Air Soil Poll 216:547–560
Chlorella vulgaris	Síntesis de fosfato y polifosfato inorganico	Aitchison EA, Butt VS (1973) The relationship between the synthesis of inorganic polyphosphate and phosphate uptake by Chlorella vulgaris. J Exp Bot 34:497–510
Chlorella minutissima	Tratamiento municipal de desechos y producción de biocombustibles	Bhatnagar A, Bhatnagar M, Chinnasamy S, Das K (2010) Chlorella minutissima—a promising fuel alga for cultivation in municipal wastewaters. Appl Biochem Biotechnol 161:523–536
Euglena	Control ambiental de síntesis de carbohidratos y lípidos	Coleman LW, Rosen BH, Schwartzbach SD (1988) Environment control of carbohydrate and lipid synthesis in Euglena. Plant Cell Physiol 29:423–432
Nannochloropsis oculata	Extracción de lípidos para	Converti A, Casazza AA, Ortiz EY, Perego P, Del Borghi M (2009) Effect of temperature and

	elaborar biodiesel	nitrogen concentration on the growth and lipid content of <i>Nannochloropsis oculata</i> and <i>Chlorella vulgaris</i> for biodiesel production. Chem Eng Process 48:1146–1151
<i>Chlorella vulgaris</i>	Extracción de lípidos para elaborar biodiesel	Converti A, Casazza AA, Ortiz EY, Perego P, Del Borghi M (2009) Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of <i>Nannochloropsis oculata</i> and <i>Chlorella vulgaris</i> for biodiesel production. Chem Eng Process 48:1146–1151
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Extracción de lípidos para realizar transesterificación directa	D'Oca MGM, Viegas CV, Lemoes JS, Miyasaki EK, Moron-Villarreyes JA, Primel EG, Abreu PC (2011) Production of FAMEs from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the <i>Chlorella pyrenoidosa</i> . Biomass Bioenerg 35:1533–1538
<i>Chlorella vulgaris</i>	Extracción de proteínas, ácidos grasos y pigmentos	Seyfabadi J, Ramezanpour Z, Khoeyi ZA (2011) Protein, fatty acid and pigment content of <i>Chlorella</i>

	variando la fuente de luz	vulgaris under different light regimes. J Appl Phycol 23:721–726
Parietochloris incisa	Extracción de ácidos grasos y ácido araquidónico variando nitrógeno y luz	Solovchenko AE, Khozin-Goldberg I, Didi-cohen S, Cohen Z, Merzlyak MN (2008) Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga Parietochloris incisa. J Appl Phycol 20:245–251
Scenedesmus acutus	Biorremediación de aguas de desecho urbanas	Doria E, Longoni P, Scibilia L, Iazzi N, Cella R, Nielson E (2012) Isolation and characterisation of a Scenedesmus acutus strain to be used for bioremediation of urban wastewater. J Appl Phycol 24:375–383
Chlorella vulgaris	Producción de lípidos	Feng Y, Chao L, Zhang D (2011) Lipid production of Chlorella vulgaris cultured in artificial wastewater medium. Bioresour Technol 101:101–105

Fuente: D Girollo, AAH Vieira, BS Paulsen Journal of phycology, 2003

2. METODOLOGÍA

Cuadro Resumen de Metodologia:

Metodo	Descripción
I.10.1 Materiales	Listado de materiales, equipo y reactivos que se emplearon
I.10.2 Obtencion de muestras	Describe como se tomaron las muestras y el trabajo de campo que se realizo
I.10.3 Identificacion taxonómica de microalgas	Que método se emplea para identificar las microalgas
I.10.4 Establecimiento de cultivos	Como se desarrollo biomasa de las diferentes cepas de microalgas aisladas
I.10.5 Preparacion de soluciones madre	Explica como se prepararon los medios de cultivo empleados
I.10.6 Vitaminas	Describe las vitaminas que se usaron
I.10.7 Medio Plymouth	Medio de cultivo
I.10.8 Medio f/2 de Guillard	Medio de cultivo
I.10.9 Medio de suelo y agua	Medio de cultivo
I.10.10 Inoculación	Como sembrar las cepas en los

	diferentes medio de cultivo
I.10.11 Monitoreo	Control de crecimiento por conteo
I.10.12 Aislamiento	Tecnicas de aislamiento de microalgas, micromanipulación, estriado y dillucion
I.10.13 Determinacion de carotenoides	Metodo espectrofotométrico
I.10.14 Metodo alternativo	Determinacion de carotenoides
I.10.15 Tipos de fotobioreactores	Diseño de fotobiorreactores empleados para el desarrollo de biomasa

Fuente: Estrada Palencia y colaboradores, 2013

2.1 Materiales

Recipientes de polietileno o policarbonato para soluciones madre de minerales.

Reactivos para medios de cultivo:

Medio Basal de Bold

NaNO₃; MgSO₄ · 7H₂O; CaCl₂ · 2H₂O; K₂HPO₄; KH₂PO₄; NaCl; Na-EDTA; KOH; FeSO₄ · 7H₂O; H₂SO₄; H₃BO₃; ZnSO₄ · 7H₂O; MnCl₂ · 4H₂O; MoO₃; CuSO₄ · 5H₂O; Co(NO₃)₂ · 6H₂O

Medio Chu # 10

Ca(NO₃)₂; K₂HPO₄; MgSO₄ · 7H₂O; Na₂CO₃; Na₂SiO₃; FeCl₃

Medio BG-11

Ácido cítrico; Citrato férrico de amonio; NaNO_3 ; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Na_2CO_3 ; $\text{MgNa}_2\text{EDTA} \cdot \text{H}_2\text{O}$; H_3BO_3
 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Medio de cultivo Murashige y Skoog; Destilador de agua; Autoclave tipo olla 45Lt; Antibióticos (penicilina, gentamicina, dihidroestreptomicina); Agar-agar; Cajas de Petri pequeñas (55mm) desechables; Cajas de Petri 90 mm desechables; 500 tubos de ensayo tapadera de rosca; Filtros de membrana de celulosa (45mm, 0.4 μm); Potenciómetro de mesa; Cámara de cultivos vegetales; Microscopio invertido con cámara fotográfica; Equipo de filtración al vacío; Redes de plancton con mesh 50-60 μ ; Balsa inflable con motor; Fluorómetro; Cámara fotográfica con adaptador para microscópico; Manguera para aireación; Válvulas de 5 salidas; Bomba para acuario 2 salidas; Piedras de aireación; T's para manguera de acuario; Bomba de vacío; Pipeteadores automáticos de 5 canales; Viales de 2 ml con tapadera; Gradillas para viales de 2 ml; Lugol; Sonda multiparametros; Kit de análisis de agua portátil (DREL 2800 Complete Water Quality Lab u otro); Botella de van Dorn; Disco de Secci; Aire acondicionado; Estanterías plásticas; Lámparas fluorescentes de espectro completo (idealmente); GPS; Centrifugadora; Accesorios eléctricos; Productos plásticos varios; Hieleras; Cristalería; Productos de tubería de PVC; Timers para control de corriente eléctrica; Materiales eléctricos

2.2 Obtención de muestras y trabajo de campo

El trabajo de campo se divide en dos épocas: seca y lluviosa para todos los sitios, porque en Guatemala se cuenta con dos estaciones. La época lluviosa va de mayo a octubre, y la seca de noviembre a abril. Marzo y abril son los meses más cálidos; diciembre y enero los más fríos. Se realizará una fase de colecta en época seca en todas las zonas: occidente (A), oriente (B), centro (C), sur (D) y norte (E) del país. Los muestreos se realizarán en la zona E tomando los departamentos de: Alta Verapaz, Baja Verapaz, Petén e Izabal. Se cubrirá la zona B con los departamentos de: Santa Rosa, Jutiapa, Chiquimula y Jalapa. En la zona C se tomaron en cuenta: Sacatepéquez y Guatemala. En la zona D: Escuintla. Y en la zona A: Sololá, Quetzaltenango, Retalhuleu y Suchitepéquez (ver cuadro 1). Se realizó otra fase de colecta en época lluviosa en las mismas zonas del país. Siendo un total de dos colectas por cada zona del país, una para cada una de las dos épocas del año.

Los sitios de muestreo fueron muestreados de la manera descrita a continuación. Se utilizó un diseño experimental de bloques para seleccionar los puntos de muestreo en lagos, lagunas y ríos, usando como factor de estratificación, la distancia desde la orilla hacia el centro del cuerpo de agua. Las muestras fueron tomadas por arrastre de una red de plancton sobre la superficie del agua durante 5 minutos a velocidad lenta (± 10 km/hr) y constante de navegación. Para cada sitio se colectaron dos muestras, una de las cuales se mantendrá en una hielera con agua fría, y otra que se fijo con lugol, utilizando botes de plástico biológicamente inerte. Para cada sitio de muestreo se tomarán como mínimo cinco puntos de muestreo, dependiendo del tamaño del cuerpo de agua, cada uno de los cuales será identificado por sus coordenadas geográficas utilizando un geoposicionador (GPS). Además, se midieron los parámetros siguientes mediante una sonda multiparámetros:

oxígeno disuelto, salinidad, temperatura, pH, demanda biológica de oxígeno (DBO), entre otros). Los muestreos estarán sujetos a la diversidad de variables ecológicas (sustrato, cercanía a desembocaduras, contaminación, entre otras), los cuales se tomarán en cuenta en el momento de realizar los análisis estadísticos.

Los datos se interpretaron mediante análisis de correspondencia canónica. Este permitió comparar los cuerpos de agua en relación a las especies de microalgas presentes, biogeografía, origen, además de las variables ecológicas (variables medidas con la sonda y factores ambientales locales). Además, se comparó la similitud de los cuerpos de agua con respecto a su diversidad mediante un análisis de agrupamiento jerárquico utilizando datos de presencia o ausencia de las especies, calculándose las distancias con el índice de Jacard. También se obtuvo los índices de riqueza y de estas muestras, los índices de biodiversidad de fitoplancton de cuerpos de agua de Guatemala.

2.3 Identificación taxonómica de microalgas

Se identificaron las especies de microalgas utilizando libros de taxonomía de microalgas y sitios web con fotografías especializados en taxonomía. Además, se guardará un registro fotográfico digital de todas las especies, por sitio de muestreo.

2.4 Establecimiento de cultivos ex situ de las especies predominantes

Los contenedores para el establecimiento de microalgas seguirán la metodología planteada por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación-FAO (Torrentera, 1989). De manera que se controlarán las siguientes variables: macronutrientes o factores limitantes del crecimiento el carbono, Nitrógeno, Fósforo, Silicio, Magnesio, Potasio y Calcio, que se requieren en cantidades relativamente grandes, mientras que los

llamados micronutrientes (Fierro, Manganeso, Cobre, Zinc, Sodio, Molibdeno, Cloro y Cobalto) la temperatura, la aireación, fotoperíodo, y el control de bacterias u otros organismos que perjudiquen su subsistencia. Se establecieron un cultivo por grupo de especies que según la literatura se reporte como tolerantes y las cuales no se perjudiquen entre sí. Los parámetros anteriormente descritos se medirán cada 12 horas durante el primer mes de monitoreo y cada 24 horas en los meses siguientes.

2.5 Preparación de las soluciones madre

La selección del medio de cultivo y la concentración de los nutrientes es crucial para el crecimiento de los organismos. Los cultivos enriquecidos han sido utilizados por mucho tiempo como un paso preliminar, hacia el aislamiento de células solitarias. Se han establecido agregando nutrientes a la muestra natural, la cual enriquece la muestra para que el crecimiento algal ocurra (Andersen, 2005). Se prepararon soluciones madre de los macronutrientes (Ver Tabla 2), micronutrientes (Ver Tabla 3) y vitaminas (Ver Tabla 4). Estas se utilizaron para preparar grandes cantidades de soluciones de enriquecimiento y los medios de cultivo Plymouth Erdschreiber (Tomkins et al, 1995) y f/2 (Guillard, 1975). Se esterilizaron en autoclave y se almacenaron en botes plásticos opacos herméticos, en refrigeración.

Tabla 9: Concentraciones de reactivos utilizadas para la preparación de soluciones madre de macronutrientes.

Compuesto	Solución Madre (g/L dH ₂ O)	Medio de Cultivo
NaNO ₃	75.0 g/L dH ₂ O	f/2 de Guillard
NaNO ₃	200.0 g/L dH ₂ O	Plymouth Erdschreiber
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	5.0 g/L dH ₂ O	f/2 de Guillard
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	20.0 g/L dH ₂ O	Plymouth Erdschreiber
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	30.0 g/L dH ₂ O	f/2 de Guillard

Fuente: Andersen Robert A. Algal Culturing techniques

Estas soluciones se esterilizaron en autoclave luego de su preparación, y se utilizaron en la preparación de los medios de cultivo bajo condiciones estériles.

Tabla 10. Concentraciones de reactivos utilizadas para la preparación de soluciones madre de micronutrientes.

Compuesto	Solución madre (g/L dH ₂ O)	Cantidad
MnCl ₂ · 4H ₂ O	180.0g/L dH ₂ O	1 ml
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	22.0g/L dH ₂ O	1 ml
CoCl ₂ · 6H ₂ O	10.0g/L dH ₂ O	1 ml
CuSO ₄ · 5H ₂ O	9.8g/L dH ₂ O	1 ml
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	6.3g/L dH ₂ O	1 ml
FeCl ₃ · 6H ₂ O	-----	3.15 gr
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	-----	4.36 gr

Fuente: Andersen Robert A. Algal Culturing techniques

A 950ml de dH₂O se le agrega 1 ml de cada una de estas soluciones y se le disuelven 3.15 gr de FeCl₃ · 6H₂O y 4.36 gr de Na₂EDTA · 2H₂O para preparar una solución de metales traza.

2.6 Vitaminas

Para preparar la solución de vitaminas se agregó 1 ml de la solución madre de cianocobalamina, 1 ml de la solución madre de tiamina y 200 mg de tiamina HCl (Vitamina B1) a 950 ml de dH₂O. Se aforó a 1000 ml y esterilizó por filtración. Fue necesario su almacenamiento bajo congelación para evitar la desnaturalización (Anderson et al, 2005).

Tabla 11. Concentraciones de vitaminas utilizadas para la preparación de soluciones madre.

Compuesto	Cantidad	Solución Madre
Cianocobalamina (Vitamina B)	1 ml	1.0 g/L dH ₂ O
Biotina (Vitamina H)	1 ml	1.0 g/L dH ₂ O
Tiamina · HCl (Vitamina B1)	200 mg	-----

Fuente: Andersen Robert A. Algal Culturing techniques

2.7 Medio Plymouth Erdschreiber

Se preparó una solución de agua de mar al 95% combinando 902.5 ml de agua de mar filtrada con 47.5 ml de agua destilada. Esta solución y las demás se esterilizaron en autoclave a 15 psi durante 15 min. Luego se le agregó en condiciones asépticas 1 ml de la solución de NaNO₃, 1 ml de la solución de Na₂HPO₄ · 12H₂O y 50 ml del extracto de suelo (Tompkins et al, 1995).

2.8 Medio f/2 de Guillard

Se agregaron a 950 ml de agua de mar filtrada los componentes presentados en la Tabla 5.

Tabla 12: Volúmenes necesarios de soluciones madre para la preparación del medio de cultivo f/2 de Guillard.

Cantidad	Compuesto	Solución Madre
1 ml	NaNO ₃	75 g/L dH ₂ O
1 ml	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	5 g/L dH ₂ O
1 ml	Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	30 g/L dH ₂ O
1 ml	Solución de metales traza f/2	
0.5 ml	Solución de vitaminas f/2	

Fuente: Andersen Robert A. Algal Culturing techniques

Se aforó a 1 Lt con agua de mar filtrada y se esterilizó en autoclave. Es preferible si la solución de vitaminas se agrega en condiciones asépticas posteriormente a la esterilización (Guillard, 1975).

2.9 Medio de Suelo y Agua

Este medio se prepara colocando de 1 a 2 cm de tierra en un tubo de ensayo (o frasco), se agrega agua destilada o desmineralizada hasta $\frac{3}{4}$ del recipiente. Se tapa y se esteriliza durante una hora en dos días consecutivos. Estos medios de cultivo se guardan en refrigeración hasta el momento de ser utilizados (Andersen, 2005).

2.10 Inoculación de las soluciones de enriquecimiento

Frascos de 500 ml con 300ml de cada solución de enriquecimiento serán inoculados con las 20 ml de cada muestra de fitoplancton utilizando pipetas volumétricas. Estos frascos se rotularán y se colocaron en un tramo de la estantería con luz lateral a un fotoperiodo de 12 horas, colocándose aireación mediante una manguera conectada a una bomba de acuario.

2.11 Monitoreo y observación de los cultivos.

Los cultivos se monitorearon tres días alternos a la semana para observar el desarrollo, identificando las especies y observando la apariencia. Entre la tercera y cuarta semana de crecimiento se llevarán a cabo las observaciones de los cultivos. Para esto se agitará primero cada tubo, desprendiendo las células adheridas a la pared del tubo y homogenizando el cultivo. Se montarán tres gotas de muestra sobre un portaobjetos, cubriendo cada una y se observaron en el microscopio de luz a un aumento de 400X en la mayoría de los casos. Se tomarán fotografías de las nuevas especies que se vayan observando.

2.12 Técnicas de aislamiento

2.12.1 Aislamiento por micromanipulación

- Se prepara la cámara de flujo laminar de la siguiente manera:
- Se desinfectan todas las superficies con etanol al 70%.
- Se introduce el microscopio invertido y se desinfecta del mismo modo.
- Se introducen cajas de Petri con medio de cultivo estéril, tubos de ensayo con medio de cultivo líquido y sólido.
- Se colocan portaobjetos, mechero de alcohol o incinerador eléctrico, pipetas Pasteur estériles, pipeteadores, tubos capilares con la punta

reducida, manguera Tygon de 1mm de diámetro y 4 pies de longitud, beaker de 1,000 ml., papel Parafilm, marcador permanente.

- Se enciende el ventilador y la luz ultravioleta durante 20 minutos antes de comenzar.
- Se preparan dos personas, una como asistente y otra para el aislamiento, con bata limpia, manos lavadas minuciosamente y desinfectadas con etanol al 70%.
- Se escogen los tubos de cultivos de enriquecimiento y las muestras del mar que se utilizarán para la micromanipulación.
- Se conecta un capilar reducido a la manguera Tygon y se coloca alrededor del cuello. Se flamea con cuidado el capilar para esterilizar.
- Se monta una muestra de cultivo de microalgas sobre un portaobjetos, sin colocar cubreobjetos, sobre la platina del microscopio y se inicia la búsqueda de especímenes saludables de la especie de microalga deseada. En esta fase se apaga el ventilador de flujo debido a que la vibración afecta en la observación y micromanipulación.
- Se flamea un portaobjetos, y al enfriarse se colocan 4 gotas separadas de medio de cultivo estéril. Utilizando una pipeta Pasteur, y se pone en una superficie libre del microscopio cerca de la platina.
- Se elige un espécimen y se succiona con el capilar de la siguiente manera:
 - Se coloca el extremo libre de la manguera entre los labios, tapando el orificio con la lengua.
 - Se toma con una mano el extremo del capilar y se acerca a la muestra, observando a una magnificación de 40X.

- Al estar el capilar justo sobre el espécimen se introduce la punta fina del capilar, colocándola sobre la célula, y destapando el otro extremo de la manguera se succiona por capilaridad. En caso que no la absorba, se vacía el capilar y se vuelve a intentar. En ocasiones es necesario succionar con la boca.
- Se expulsa el contenido del capilar dentro de la primera gota de medio de cultivo estéril en el otro portaobjetos, colocando este sobre la platina.
- Es posible aislar varias células (tandas) antes de proceder a limpiarlas, o limpiar una por una.
- Para limpiar una célula (o cadena de células) se succiona de la misma manera la célula aislada y se pasa por tres gotas de medio de cultivo estéril. Es aconsejable flamear el capilar antes de succionar una célula.
- Habiendo succionado la célula de la última gota se conecta el ventilador.
- Se inocular la célula sobre medio de cultivo sólido en caja de Petri o tubo de ensayo, o en medio de cultivo líquido (f/2 o f/10 de Guillard) en tubo de ensayo.
- Si es en caja de Petri se pueden inocular hasta 6 células, sellando con Parafilm.
- Los recipientes de cultivo se colocan bajo iluminación en las estanterías a un fotoperiodo de 12 horas, los tubos de ensayo en gradillas.

2.12.2 Aislamiento por dilución

Esta es una técnica muy utilizada. Es efectiva para organismos abundantes en una muestra pero poco efectiva para organismos raros. El objetivo del método es depositar solamente una célula dentro de un tubo de ensayo o vial y, por lo tanto, establecer un aislado unialgal. Si se conoce la densidad celular se puede calcular la dilución necesaria para obtener cultivos que contengan una sola célula. Si no es factible conocer la densidad celular, se pueden realizar diluciones en serie desde 1:10 hasta 1:1,000,000. Esta se utiliza cuando se desea cultivar especies de microalgas al azar a partir de muestras de campo. A partir de la última dilución se preparan varios tubos de cultivo, asumiendo que en algunos se desarrollen cultivos a partir de una célula, algunos de más de una y otros de ninguna célula. Así mismo, se pueden agregar algunos elementos en la dilución final que estimulen el desarrollo de especies con requerimientos particulares, o que eliminen especies no deseadas (Andersen, 2005).

2.13 Determinación de Carotenoides por espectrofotometría:

El método se fundamenta en la medición de la absorbancia de un extracto de los carotenoides presentes en el alimento y luego mediante el uso de una curva de calibración o la aplicación se calcula el contenido de carotenoides en la muestra. %11cmE

Reactivos:

1. Éter de petróleo
2. Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4)
3. Solución concentrada de beta-caroteno en alcohol isopropílico/cloroformo (25:75) (80mg/ ml).

4. Solución diluida de beta-caroteno (10 ml de solución concentrada + éter de petróleo en cantidad suficiente para 100 ml).

Análisis de betacaroteno:

1. Curva patrón:

Tomar 5 tubos de ensayo y enumerar del 1 al 5. Colocar en cada uno de ellos las cantidades de reactivos que se especifican a continuación:

Tubo No.	1	2	3	4	5
ml de solución diluida del estándar de beta caroteno	0	2	4	6	8
ml de solvente puro (éter de petróleo)	10	8	6	4	2

Fuente: Estrada Palencia, E y colaboradores 2013

Agitar con cuidado los tubos y determinar la absorbancia de cada solución a la longitud de onda máxima.

Construir la curva de calibración trazando un grafico de la absorbancia correspondiente contra la concentración de beta-caroteno contenida en cada una de las soluciones patrón.

2.14 Determinación del contenido de carotenoides totales en biomasa:

1. Pesar aproximadamente 1g de muestra de biomasa
2. Homogenizar en una licuadora con 60 ml de acetona por unos 3 minutos.
3. Decantar y agregar más acetona para realizar una extracción. Repetir el proceso hasta extraer completamente los pigmentos.

Filtrar y lavar el residuo que queda en el papel de filtro con unos 20-30 ml de acetona.

5. Concentrar en campana con un baño de María (o en estufa eléctrica) hasta un volumen de 5ml.

6. Agregar 60 ml de éter de petróleo.

7. A la solución etérea que contiene los carotenoides agregar una pequeña cantidad de Na_2SO_4 anhidro. Dejar la solución con el agente desecante unos 15 minutos, agitar ocasionalmente.

8. Transferir cuantitativamente la solución etérea a un matraz aforado de 100 ml y llevar a volumen con éter de petróleo.

9. Tomar con una pipeta 2 ml de esta solución y transferir a un tubo.

10. Agregar 8 ml de éter de petróleo y medir la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción encontrada previamente.

Cálculos:

1. Determinar por medio de la curva estándar la cantidad de carotenoides totales presentes en la muestra. Expresarlos como mg de beta-carotenos/100 g de muestra.

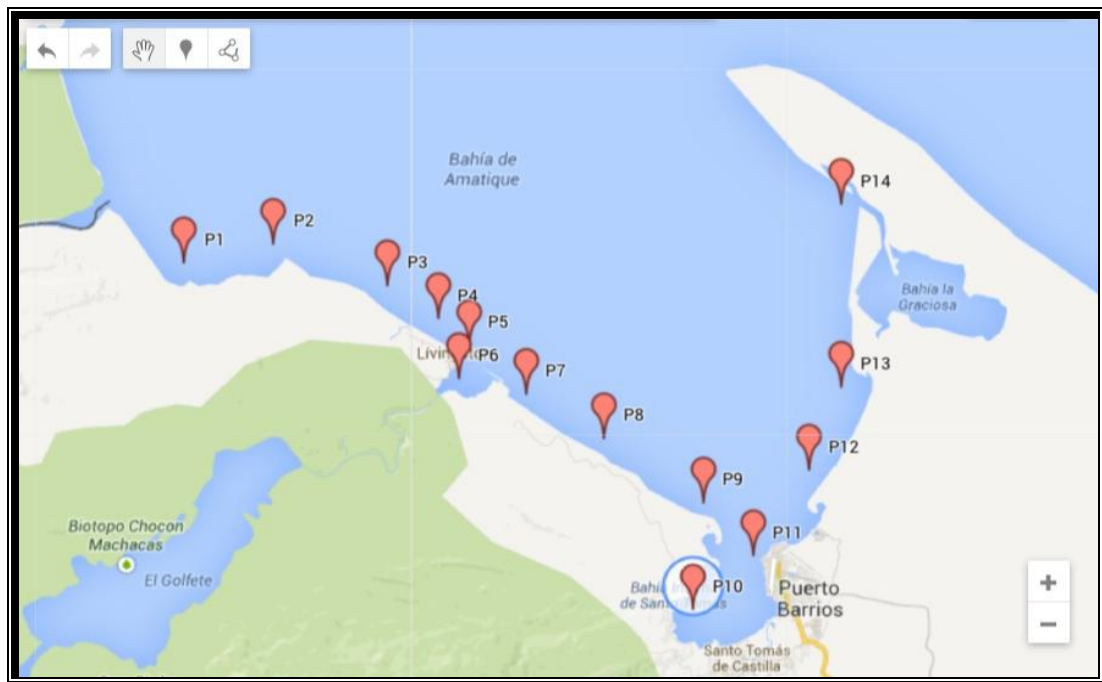
2. Calcular la cantidad de carotenoides totales expresados como beta-caroteno utilizando la constante $11\text{cm}^2/\text{g}$

3. Comparar ambos resultados.

3. RESULTADOS

A continuación se muestra el mapa con los puntos de muestreo seleccionados, todos en el litoral Atlántico del país.

3.1 Mapa 1: Area de estudio y puntos de muestreo



Fuente: Estrada Palencia, y colaboradores 2013

La tabla 13 muestra la síntesis del trabajo que se llevo a cabo con las muestras de microalgas que se tomaron en los diferentes puntos.

3.2 Tabla 13 : Inventario de microalgas del Atlántico de Guatemala

Microalga	Microalgas aisladas en los puntos 6,10,11 y 14	Microalgas Observadas al microscopio	Microalgas Identificadas por medio de claves	Microalgas Aisladas en medio liquido	Microalgas aisladas en medio solido (agar)	Desarrollo de biomasa en tubo de ensayo	Desarrollo de biomasa en botella	Desarrollo de biomasa en fotobioreactor
<i>Ameboide sp</i>	X	✓	X	X	X	X	X	X

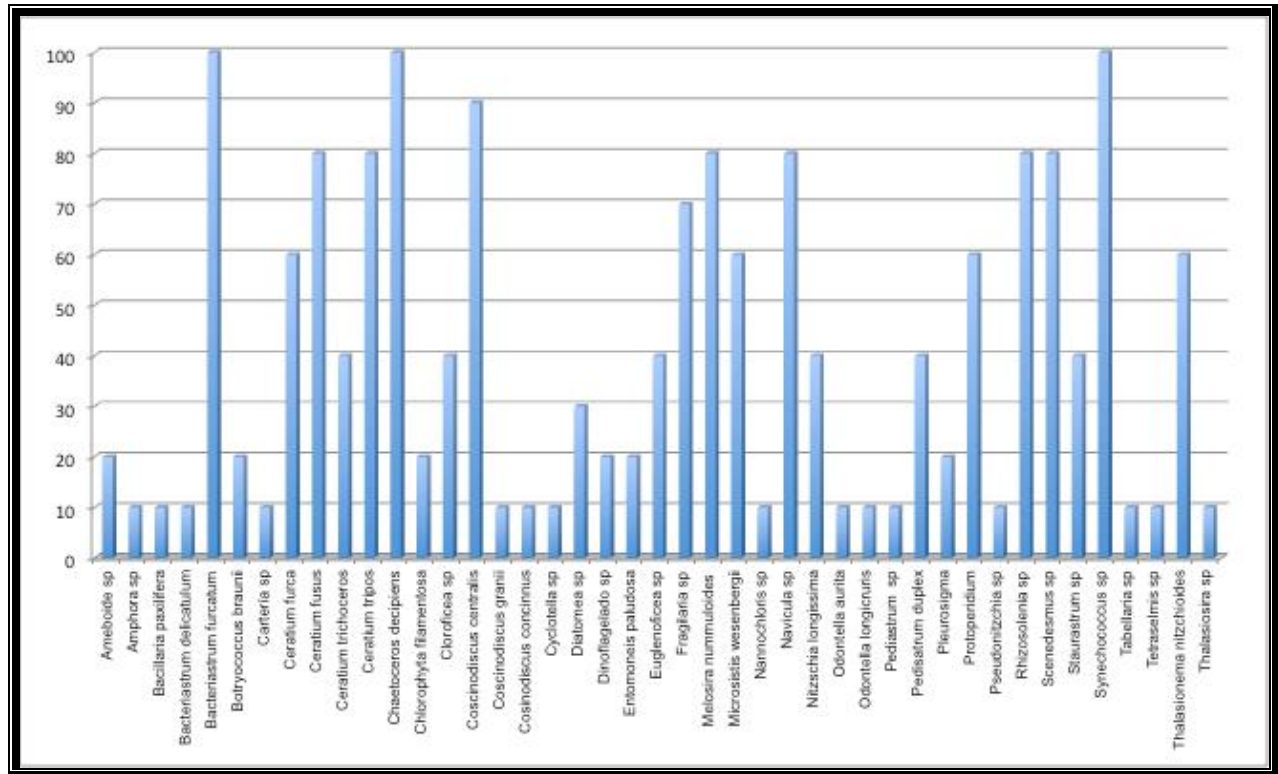
<i>Amphora</i> sp	✓	✓	X	X	X	X	X	X
<i>Bacillaria paxillifera</i>	X	✓	✓	✓	X	X	X	X
<i>Bacteriastrium delicatulum</i>	X	✓	✓	X	X	✓	✓	X
<i>Bacteriastrium furcatum</i>	X	✓	✓	X	X	X	X	X
<i>Botryococcus braunii</i>	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X
<i>Carteria</i> sp	X	✓	X	X	X	X	X	X
<i>Ceratium furca</i>	X	✓	✓	X	X	✓	✓	X
<i>Ceratium fusus</i>	X	✓	✓	X	X	X	X	X
<i>Ceratium trichoceros</i>	X	✓	✓	✓	X	✓	X	X
<i>Ceratium tripos</i>	X	✓	✓	X	X	X	X	X
<i>Chaetoceros decipiens</i>	X	✓	✓	X	X	X	X	X
<i>Chlorophyta filamentosa</i>	X	✓	✓	X	X	✓	✓	X
<i>Cloroficea</i> sp	X	✓	X	X	X	✓	✓	✓
<i>Coscinodiscus centralis</i>	✓	✓	✓	X	X	✓	✓	✓
<i>Coscinodiscus granii</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Cosinodiscus concinnus</i>	X	✓	✓	X	X	X	X	X
<i>Cyclotella</i> sp	✓	✓	X	✓	X	✓	✓	✓
<i>Diatomea</i> sp	X	✓	X	X	X	✓	✓	✓
<i>Dinoflagelado</i> sp	X	✓	X	X	X	✓	X	X
<i>Entomoneis paludosa</i>	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Euglenoficea</i> sp	X	✓	X	X	X	X	X	X
<i>Fragilaria</i> sp	X	✓	X	X	X	✓	X	X
<i>Melosira nummuloides</i>	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X
<i>Microsistis wesenbergii</i>	X	✓	✓	X	X	X	X	X
<i>Nannochloris</i> sp	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Navicula</i> sp	X	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Nitzschia longissima</i>	✓	✓	✓	X	X	✓	✓	✓

<i>Odontella aurita</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Odontella longicruris</i>	X	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓
<i>Pediastrum sp</i>	X	✓	X	✓	X	✓	✓	X
<i>Pedisastrum duplex</i>	X	✓	✓	X	X	X	X	X
<i>Pleurosigma</i>	X	✓	X	X	X	X	X	X
<i>Protoperidium</i>	X	✓	X	X	X	X	X	X
<i>Pseudonitzschia sp</i>	✓	✓	X	X	X	X	X	X
<i>Rhizosolenia sp</i>	X	✓	✓	X	X	X	X	X
<i>Scenedesmus sp</i>	X	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Staurostrum sp</i>	X	✓	X	X	X	X	X	X
<i>Synechococcus sp</i>	X	✓	X	X	X	✓	X	X
<i>Tabellaria sp</i>	✓	✓	X	X	X	X	X	X
<i>Tetraselmis sp</i>	✓	✓	X	✓	X	✓	✓	✓
<i>Thalasionema nitzchioides</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Thalasiosira sp</i>	✓	✓	X	X	X	✓	✓	✓

Fuente: Estrada Palencia, y colaboradores 2013

Debido a que las diferentes cepas de microalgas tienen requerimientos nutricionales y de medio ambiente característicos, no fue posible obtener los mismos resultados con todas bajo las mismas condiciones de desarrollo, medio de cultivo, concentración de macro y micro nutrientes, temperatura, salinidad, fotoperiodo, aireación, etc. Todas y cada una de estas cepas requieren de condiciones específicas para su desarrollo, por lo que se tendrán que realizar estimaciones de las condiciones ideales individuales si se pretende desarrollar biomasa de una cepa en particular.

3.3 Grafico 1: Abundancia relativa de microalgas.


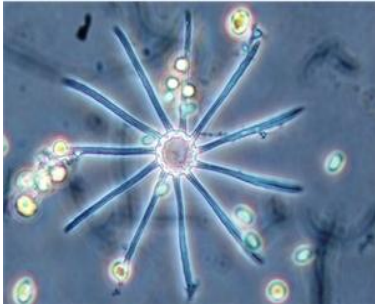


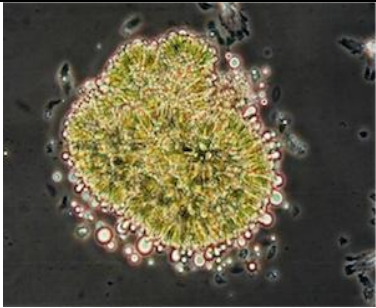
Fuente: Estrada Palencia, y colaboradores 2013

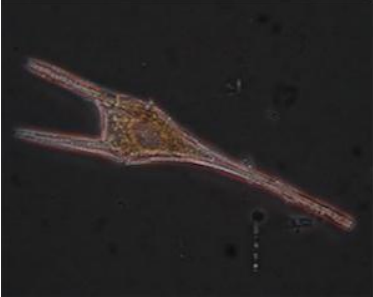
No todas las microalgas se logran adaptar a condiciones de estrés, algunas simplemente mueren ya que sus requerimientos de desarrollo son muy específicos. En la grafica anterior se muestran las diferentes especies de microalgas identificadas y su abundancia relativa con respecto a los puntos de muestreo considerados, vale la pena mencionar que dependiendo de factores como la época del año en la que se toma la muestra, temperatura, salinidad, turbidez, concentración de nutrientes, pH, etc. Se encontraron a las cepas de microalgas en mayor o menor numero con respecto a las demás en los puntos muestreados.

3.4 Listado de microalgas aisladas e identificadas :

A continuación se presentan los resultados individuales de las diferentes microalgas identificadas en el litoral Atlántico del país.

<i>Bacteriastrum delicatulum</i>	
<p>Nombre científico: Bacteriastrum delicatulum Cleve 1897</p> <p>Clase: Bacillariophyceae</p> <p>Familia: Chaetocerotaceae</p> <p>Aumento: 400X</p> <p>Distribución: aguas templadas de todo el mundo</p> <p>Descripción de la especie: Las setas terminales de ambos extremos están dirigidos hacia la cadena, apicalmente se pueden observar como las setas se bifurcan al final.</p>	
<i>Bacteriastrum furcatum</i>	
<p>Nombre científico: Bacteriastrum furcatum</p> <p>Clase: Bacillariophyceae</p> <p>Familia: Chaetocerotaceae</p> <p>Aumento: 400X</p> <p>Distribución: cosmopolita</p>	

<p>Descripción de la especie: Las setas terminales son curvas en los extremos y se doblan perpendicularmente hacia el interior de la cadena.</p>	
<p style="text-align: center;"><i>Botryococcus braunii</i></p>	
<p>Nombre científico: Botryococcus braunii</p> <p>Clase: Chlorophyceae</p> <p>Familia: Dictyosphaeriaceae</p> <p>Aumento: 400x</p> <p>Tamaño: 6-10 µm de largo, 3-6 µm ancho</p> <p>Distribución: Mundial</p> <p>Descripción: tiene gran importancia en el campo de la biotecnología, sus poblaciones se multiplican en presencia de fosforo inorgánico disuelto, la especie produce hidrocarburos especialmente aceites en la forma de triterpenos, que forman 30-40% de su peso en seco, comparadas con otras algas verdes poseen una pared celular grueso acumulada de divisiones previas. (Metzger and Largeau, 2005) Su crecimiento optimo se da a 23° C y a una intensidad de luz de 60W/M2, con un fotoperiodo de 12 horas por día y una salinidad de 0.15 Molar de NaCl, comúnmente se cultiva en CHU13 (Li y</p>	

<p>Qin, 2005). <i>B. braunii</i> tiene un potencial alto para biodiesel, pues producen una variedad de lípidos e hidrocarburos (Metzger and Largeau, 2005) y que puede ser utilizada como materia prima para producción de combustibles por métodos químicos. (Hillen, et al. 1982)</p>	
<p style="text-align: center;"><i>Ceratium furca</i></p>	
<p>Nombre científico: <i>Ceratium furca</i> (Ehrenberg) Claparède et Lachmann 1858</p> <p>Sinonimos: <i>Peridinium furca</i> Ehrenberg 1836</p> <p>Clase: Dinophyceae</p> <p>Familia: Ceratiaceae</p> <p>Aumento: 400X</p> <p>Tamaño: Largo 70-200 µm, ancho 30-50 µm.</p> <p>Distribución: se distribuye principalmente en zonas costeras, pero puede ser encontrada en estuarios y ambientes oceánicos, cosmopolita. (Steidinger y Tangen, 1996).</p> <p>Descripción: especies grandes con dos cuernos, paralelos, desiguales o a veces divergentes. El cuerno derecho más corto que el izquierdo. Cuernos de la hipoteca serrados. La epiteca se transforma gradualmente en un cuerno apical. A veces se confunde con <i>C.</i></p>	

hircus. Aunque C. hircus es mas pequeño y se restringe a estuarios y costas de aguas calientes. El cuerno de C. hircus esta drigido ventralmente. C.hircus es de color cafe oscuro o cafe amarillo. C. furca es mas amarilla que café. (Steidinger y Tangen, 1996)

Carteria

Nombre científico:

Clase:

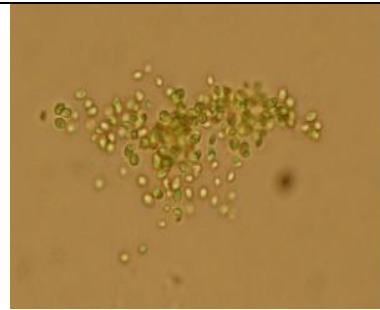
Familia:

Aumento:

Tamaño:

Distribución:

Descripción de la especie:



Ceratium fusus


Nombre científico: Ceratium fusus (Ehrenberg)
Dujardin 1841

Sinonimos: Peridinium fusus Ehrenberg 1834

Clase: Dinophyceae

Familia: Ceratiaceae



<p>Aumento: 400X</p> <p>Tamaño: largo 200-540 μm, ancho 5-30 μm .</p> <p>Distribución: Cosmopolita</p> <p>Descripción de la especie: Célula grande fusiforme con el cuerno apical bien desarrollado, el cuerno izquierdo de la hipoteca completamente desarrollado, el derecho rudimentario. El cuerno izquierdo a veces levemente curvado o recto. La epiteca se reduce gradualmente hacia el cuerno apical. La superficie con marcas lineares. Parecido a <i>C. extensum</i> el cual es considerablemente mas grande (>1mm) con un largo y recto cuerno de la hipoteca. (Steidinger y Tangen, 1996)</p>	
<p><i>Ceratium trichoceros</i></p>	
<p>Nombre científico: <i>Ceratium trichoceros</i> (Ehrenberg) Kofoid 1908</p> <p>Sinonimos: <i>Peridinium trichoceros</i> Ehrenberg</p> <p>Clase: Dinophyceae</p> <p>Familia: Ceratiaceae</p> <p>Aumento: 400x</p> <p>Tamaño: Largo 70-200 μm, ancho 30-50 μm.</p> <p>Distribución: Oceanica y costera, cosmopolita</p>	

en aguas templadas y aguas tropicales, distribución mundial. (Steidinger y Tangen, 1996)

Descripción: Celulas muy similares a *C. massiliense* con cuernos característicos. Los cuernos apicales y de la hipoteca en planos paralelos. (Steidinger y Tangen, 1996)

Ceratium tripos

Nombre científico: *Ceratium tripos* (O.F. Müller) Nitzsch 1817

Sinonimos: *Cercaria tripos* O. F. Müller 1781

Clase: Dinophyceae

Familia: Ceratiaceae

Aumento: 400x



Tamaño: largo 195-360 µm, ancho 65-90 µm.

Distribución: Cosmopolita

Descripción: Células grandes con epitoca triangular que se convierte abruptamente en el cuerno apical, los cuernos de la hipoteca cerrados y bien desarrollados casi paralelos con el cuerno apical. (Steidinger y Tangen, 1996)



Chaetoceros decipiens

<p>Nombre científico: Chaetoceros decipiens Cleve 1873</p> <p>Clase: Bacillariophyceae</p> <p>Familia: Chaetocerotaceae</p> <p>Aumento: 400X</p> <p>Tamaño: 9-84 µm</p> <p>Distribución: Mundial</p> <p>Descripción de la especie: Cadenas rectas y rígidas. Las esquinas de las valvas tocan las esquinas de las células adyacentes. Ranuras en forma lineal o ampliamente lanceoladas. Setas hermanas fusionadas al inicio. Las setas terminales más gruesas que las demás.</p>	
Cloroficea	
<p>Nombre científico:</p> <p>Clase:</p> <p>Familia:</p> <p>Aumento:</p> <p>Tamaño:</p> <p>Distribución:</p> <p>Descripción de la especie:</p>	

Coscinodiscus granii

Nombre científico: Coscinodiscus granii

Clase: Coscinodiscophyceae

Familia: Coscinodiscaceae

Aumento: 400X

Tamaño:

Distribución: Marina

Descripción de la especie:



Cosinodiscus concinnus

Nombre científico: Coscinodiscus concinnus W. Smith

Clase: Bacillariophyceae

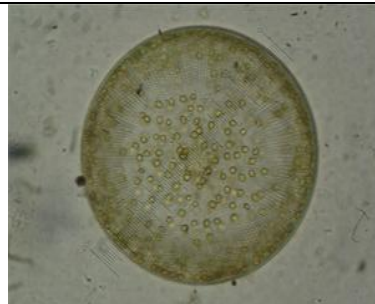
Familia: Coscinodiscaceae

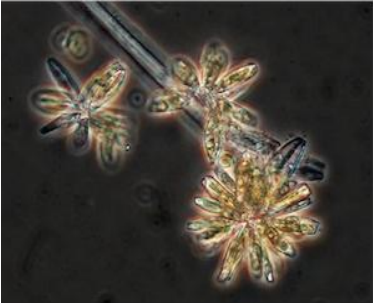
Aumento: 400X

Tamaño: diametro 110-500 µm

Distribución: Marina.

Descripción de la especie: pared celular delgada, en vista cingular las valvas convexas, numerosos cloroplastos fimbriados, apéndices marginales distinguibles. En vista valvar se puede observar una roseta central grande con



<p>una area hialina en forma de estrella. El tamaño del área hialina y el desarrollo de las paredes de las aréolas son variables. Los dos apéndices marginales aprox. 135° de distancia. C. concinnus se distingue por tener una mayor distancia entre los apéndices y el margen de la valva que C.centralis, C.concinniformis y C.wailesii. (Hasle y Syversten, 1996).</p>	
<p style="text-align: center;"><i>Diatomea</i></p>	
<p>Nombre científico:</p> <p>Clase:</p> <p>Familia:</p> <p>Aumento:</p> <p>Tamaño:</p> <p>Distribución:</p> <p>Descripción de la especie:</p>	
<p style="text-align: center;"><i>Entomoneis paludosa</i></p>	

Nombre científico: Entomoneis paludosa

Clase: Bacillariophyceae

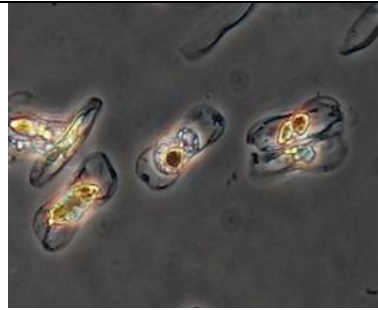
Familia: entomoneidaceae

Aumento: 400x

Tamaño:

Distribución:

Descripción de la especie: Frústulas casi siempre vienen a descansar en vista faja, una visión que esta dominado por dos quillas arqueadas, una en cada válvula. Areolas dentro de una estria tanto en la cara de la valvula y la quilla son muy finos



Fragilaria sp

Nombre científico: Fragilaria sp1.

Clase: Bacillariophyceae

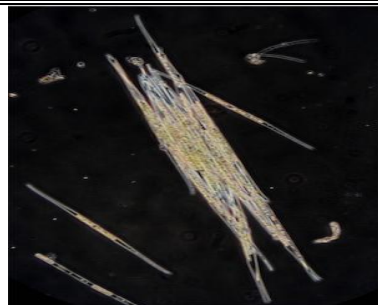
Familia:

Aumento: 400X

Tamaño:

Distribución: Marina

Descripción de la especie:



Melosira nummuloides

Nombre científico: *Melosira nummuloides* C.A. Agardh.

Clase: Bassilariophyceae

Familia: Melosiraceae

Aumento: 400X

Distribución: Marina y de agua dulce.
(Crawford, 1975)

Descripción de la especie: género de diatomea colonial que agrupa células con forma cilíndrica, un poco más largas que anchas, adheridas unas a otras por la superficie valvar. (Crawford, 1975)



Microsistis wesenbergii

Nombre científico:

Clase:

Familia:

Aumento:

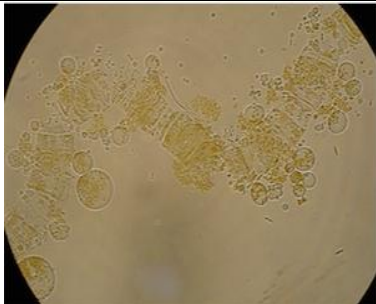
Tamaño:

Distribución:

Descripción de la especie:



<i>Navicula sp</i>	
<p>Nombre científico: <i>Navicula sp.1</i></p> <p>Clase: Bacillariophyceae</p> <p>Familia: Naviculaceae</p> <p>Aumento: 400X</p>	
<i>Nitzschia longissima</i>	
<p>Nombre científico: <i>Nitzschia longissima</i> (Brébisson, in Kützing)</p> <p>Clase: Bacillariophyceae</p> <p>Familia: Bacillariaceae</p> <p>Aumento: 400X</p> <p>Tamaño: Eje apical, 125-450 µm</p> <p>Distribución: cosmopolitas</p> <p>Descripción de la especie: todas las especies del género <i>Nitzschia</i> presentan un rafe excéntrico, células lineares o lanceoladas que gradualmente disminuyen en proyecciones largas, el rafe con fíbula y con un espacio central distintivo. Algaebase reporta 1018 especies de las cuales 315 han sido aceptadas taxonómicamente. <i>N. pungens</i> ha sido reportada como productora de ácido domoico. (Bates, et al.</p>	

1989)	
<i>Odontella aurita</i>	
<p>Nombre científico: <i>Odontella aurita</i></p> <p>Sinonimos: <i>Biddulphia aurita</i></p> <p>Clase: Baccillariophyceae</p> <p>Familia: Eupodiscaceae</p> <p>Aumento: 400X</p> <p>Tamaño: Diametro 10-95 µm</p> <p>Distribución: Cosmopolita</p> <p>Descripción de la especie: células altamente silificadas, formando cadenas, la pared celular toscamente areolada sin espinas, las cadenas enlazadas por protuberancias de mucosa, muchos cloroplastos. Takamo 1984 (hace una distinción entre <i>O. longicruris</i> y <i>O. aurita</i> en base a estudios de microscopia electrónica de barrido. La obtención de ácido eicosapentenoico EPA y ácido docosahehexanoico DHA fue reportada por Braud (1998) esta sustancia es comúnmente conocida como Omega 3. Toume e Ishibashi (2002) aislaron 5α, 8α-Epidioxysterol sulfato a partir de esta alga.</p>	

Odontella longicruris

Nombre científico: *Odontella longicruris*

Clase: Coscinodiscophyceae

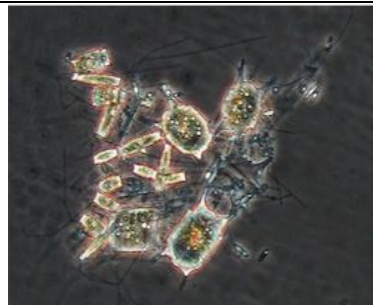
Familia: Triceratiales

Aumento: 400x

Tamaño:

Distribución: mundial

Descripción de la especie: especie marina



Pediastrum

Nombre científico: *Pediastrum* Meyen 1829.

Clase: Chlorophyceae

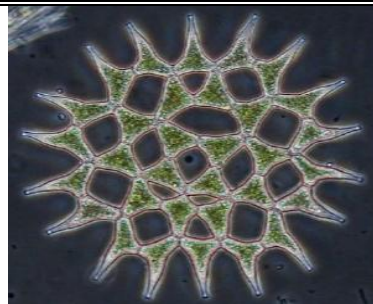
Familia: Hydrodictyceae



Aumento: 400x

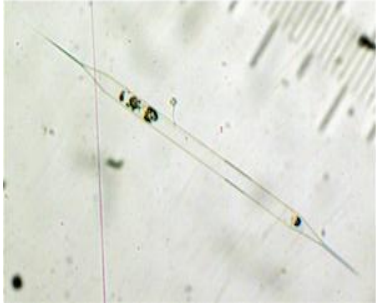
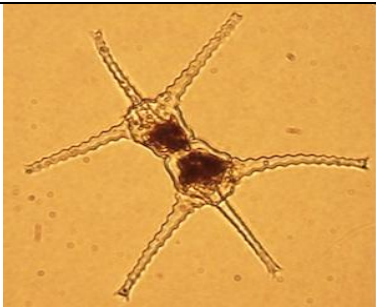
Tamaño: Colonia 15-400µm diametro, Celula 8-32 µm diametro

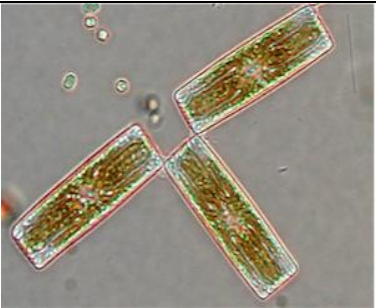
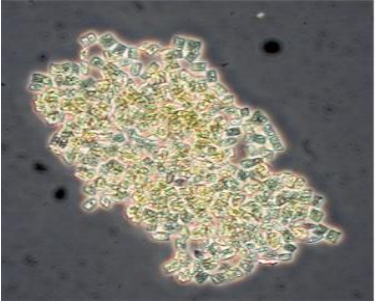
Distribución: Mundial

Descripción: Cenobio con células de 4-64 (-128) individuos, en forma de plato ovalado o circular, disco continuo con perforaciones entre las células. Células interiores polihedras con 4 o mas lados, células periféricas similares o con



<p>apéndices en forma de cuernos. Células periféricas con cerdas, ausentes en las células centrales. Células multinucleadas, con pared celular lisa, reticulada o altamente granulada. (Guiry y Guiry, 2009)</p>	
<p><i>Pleurosigma</i></p>	
<p>Nombre científico:</p> <p>Clase:</p> <p>Familia:</p> <p>Aumento:</p> <p>Tamaño:</p> <p>Distribución:</p> <p>Descripción de la especie:</p>	
<p><i>Protoperidinium depressum</i></p>	
<p>Nombre científico: Protoperidinium depressum</p> <p>Clase: Dinophyta</p> <p>Familia: Protoperidiniaceae</p> <p>Aumento: 400x</p> <p>Tamaño:</p> <p>Distribución: Mexico y Belice</p>	

<p>Descripción de la especie: Peridinales unicelulares, con dos flagelos heterocontos en el sulcus y en el cíngulo. Division celular oblicua.</p>	
<i>Rhizosolenia sp</i>	
<p>Nombre científico: Rhizosolenia sp.</p> <p>Clase: Bacillariophyceae</p> <p>Familia: Rhizosoleniaceae</p> <p>Aumento: 400X</p> <p>Tamaño: diámetro 13-230um</p> <p>Distribución: cosmopolita.</p>	
<i>Staurostrum desmidiaceae</i>	
<p>Nombre científico:</p> <p>Clase: Zygnemophyceae</p> <p>Familia: Desmidiáles</p> <p>Aumento: 400x</p> <p>Tamaño:</p> <p>Distribución:</p> <p>Descripción de la especie:</p>	
<i>Tabellaria fenestrata</i>	

<p>Nombre científico: Tabellaria fenestrata</p> <p>Clase: Bacillariophyceae</p> <p>Familia: Tabellariaceae</p> <p>Aumento: 400x</p> <p>Tamaño:</p> <p>Distribución: Golfo de Mexico</p> <p>Descripción de la especie: Diatomea de forma cuboidea que se unen por las esquinas asumiendo una forma de zigzag</p>	
<p><i>Thalasionema nitzchioides</i></p>	
<p>Nombre científico:</p> <p>Clase:</p> <p>Familia:</p> <p>Aumento:</p> <p>Tamaño:</p> <p>Distribución:</p> <p>Descripción de la especie:</p>	
<p><i>Thalassiosira sp</i></p>	

Nombre científico: *Thalassiosira* sp.

Clase: Bacillariophyceae

Familia: Thalassiosiraceae

Aumento: 400X

Descripción de la especie: las especies del genero se pueden distinguir por la presencia de lípidos y colesterol, *T.pseudonana* y *T. eccentrica* han demostrado una mayor complejidad en la estructura de lípidos y esteroides, en comparación con *T. oceánica*. En general las especies del género *Thalassiosira* poseen una predominancia de 24-Metilencolesterol. (Volkman y Hallegraeff, 1988)



Fuente: Estrada Palencia, y colaboradores 2013

En función de la utilización de claves internacionales se logro recopilar información específica de cada una de las microalgas de las cuales se incluyen fotografías.

3.5 Tabla 14: Cantidad de aceite presente en biomasa de microalgas

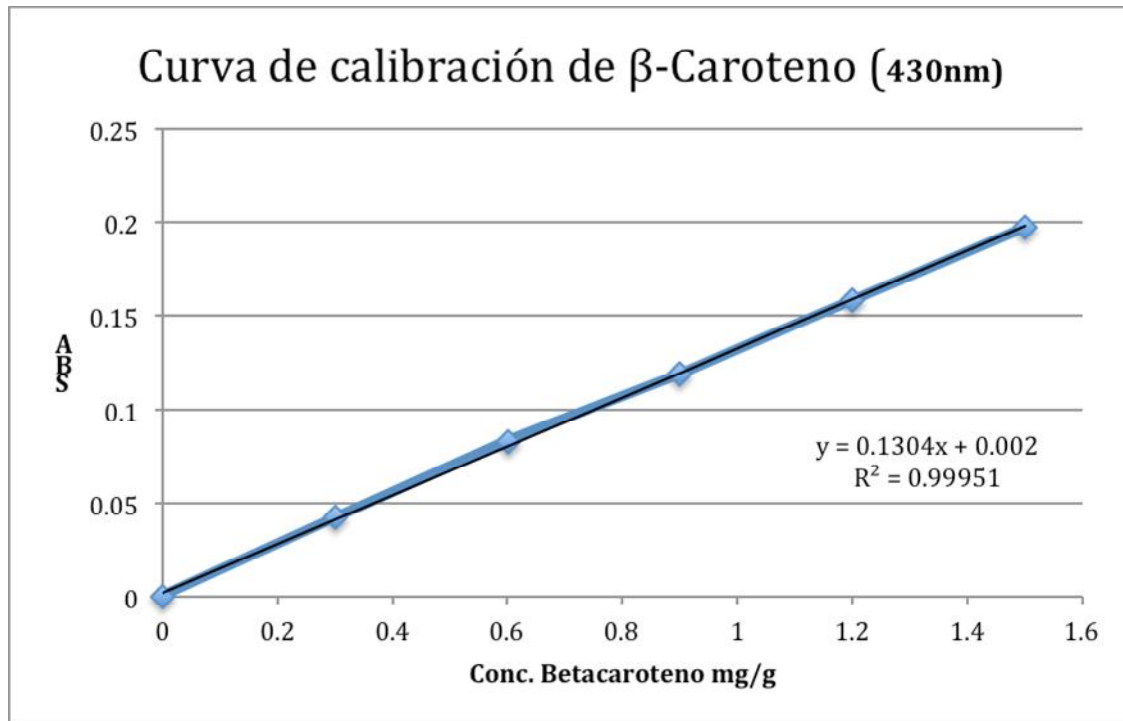
Cepa	% aceite extraído	% de aceite reportado
Botryococcus braunii	43	29-75

Chaetoceros decipiens	0	16
Nannochloris sp	ND	6-63
Navicula sp	18	45
Nitzschia longissima	0	28-50
Scenedesmus sp	5	25
Tetraselmis sp	12	15-32
Thalassiosira sp	8	20

Fuente: Estrada Palencia, y colaboradores 2013

Se realizaron con anterioridad extracciones de lípidos en microalgas variando los solventes y la relación de concentración para optimizar la cantidad de aceite extraído. Los valores experimentales se podrían mejorar sustancialmente si se emplean métodos mas exhaustivos.

3.6 Grafico 2: Curva de calibracion de Betacaroteno



Fuente: Estrada Palencia, y colaboradores 2013

En esta curva de calibracion se observa la relacion directamente proporcional entre la absorbancia de cada muestra y la concentracion de betacaroteno presente en cada una de las muestras analizadas. Se obtuvo un excelente coeficiente de correlación.

Ecuacion de la recta

$$y = 0.1304x + 0.002$$

3.7 **Tabla 15:** Determinacion de beta caroteno en cepas de microalgas

Microalga	Absorbancia nm	Betacaroteno (mg/g)
Navicula sp	0.0346	0.25
Chloroficea	0.0633	0.47
Nitzschia longissima	0.0946	0.71
Thalasionema nitzschioides	0.1011	0.76

Fuente: Estrada Palencia, y colaboradores 2013

Las concentraciones de betacaroteno que se lograron determinar, coinciden considerablemente con los valores reportados en la literatura, por lo que se puede concluir que estas cepas presentan potencial uso para la extracción de betacaroteno.

3.8 Tabla 16: Usos y aplicaciones de la cepas de microalgas del Atlántico

Cepa de microalgas identificadas en esta investigación	Extracción de lípidos	Elaboración de biocombustibles	Extracción de biomoléculas de diferentes usos	Alimento para Rotíferos, Almejas, Ostiones y Camarones	Extracción de pigmentos como clorofila, luteína, Beta caroteno	Extracción de vitaminas B-12	Alimentos para Humanos	Industria cosmética	Suplemento dietético	Tratamiento de aguas residuales	Medicamentos	Industria de colorantes
Ameboide sp												
Amphora sp												
Bacillaria paxillifera												
Bacteriastrium delicatulum												
Bacteriastrium furcatum												
Botryococcus braunii	☑	☑										
Carteria sp												
Ceratium furca			☑									
Ceratium fusus			☑									
Ceratium trichoceros			☑									
Ceratium tripos												
Chaetoceros decipiens	☑			☑								
Chlorophyta filamentosa												
Cloroficea sp					☑							☑
Coscinodiscus centralis												
Coscinodiscus granii												
Coscinodiscus concinnus												
Cyclotella sp												
Diatomea sp						☑						
Dinoflagelado sp												
Entomoneis paludosa												
Euglenoficea sp												
Fragilaria sp												
Melosira nummuloides												
Microsistis wiesenbergii			☑									
Nannochloris sp	☑											
Navicula sp	☑				☑							☑
Nitzschia longissima	☑		☑		☑							☑
Odontella aurita							☑	☑	☑			
Odontella longicruris												
Pediastrum sp												
Pediastrum duplex												
Pleurosigma												
Protoperdium												
Pseudonitzschia sp												
Rhizosolenia sp										☑		
Scenedesmus sp	☑									☑		
Staurastrum sp												
Synechococcus sp												
Tabellaria sp												
Tetraselmis sp	☑											
Thalassionema nitzschiioides					☑							
Thalassiosira sp	☑	☑	☑	☑			☑	☑		☑	☑	☑

Fuente: Estrada Palencia, y colaboradores 2013

4. ANALISIS DE RESULTADOS

Vale la pena mencionar que los puntos de muestreo que se muestran en el mapa 1, fueron elegidos en función de varios aspectos, entre ellos podemos citar: 1. Que los mismos fueran representativos en cantidad y localización, 2. Que estuvieran a una distancia constante de la playa. 3. También se consideró el aspecto geológico tratando de que fueran lo mas heterogéneos posibles para evaluar el impacto de poblaciones, puertos, ríos, penínsulas, golfetes, etc.,... 4. Basándose en el reporte de estudios de carácter científico realizados en años anteriores. Simultáneamente a la realización de los muestreos se tomaba registro de parámetros fisicoquímicos del agua con una sonda multiparametro para evaluar las condiciones de temperatura, conductividad eléctrica, salinidad. En cada punto muestreado para poder relacionar de alguna manera estos parámetros con la cantidad y tipos de microalgas presentes en dicho punto. Además se realizaba in-situ una fijación de muestras recolectadas con redes de plancton con la intención de analizar esas muestras en el laboratorio, la idea de fijarlas es que la red de plancton eventualmente captura en el proceso zooplancton el cual se alimenta de fitoplancton. Al fijar las muestras los químicos agregados matan al zooplancton evitando que este elimine las cepas de fitoplancton en el periodo que transcurre entre la toma de muestra y el traslado hacia el laboratorio, A pesar de que las muestras se transportan en cadena de frio, las mismas son sometidas a condiciones de estrés lo cual puede provocar que muchas de las cepas que están presentes se biodegraden o por fricción cambien su morfología lo que influye negativamente a la hora de identificarlas. Entre el equipo de campo se contó con un microscopio para realizar observaciones y toma de fotografías de cepas en las muestras recién colectadas, con la intención de minimizar las posibilidades de que después del traslado de las muestras al laboratorio las mismas se pudieran degradar o sufrir

alteraciones o modificaciones morfológicas producidas por el estrés del traslado.

4.1 Distribución

La melosira nummuloides se encontró principalmente en los puntos mas alejados del Golfo de Honduras en cantidades relativamente pequeñas, se caracteriza por encontrarse presente formando cadenas de diferente longitud,

Abundancia relativa en los diferentes puntos de muestreo

Se pudo observar una variación significativa en cuanto a la cantidad de algunas especies de microalgas en los diferentes puntos de muestreo, esto relacionado íntimamente con los parámetros fisicoquímicos del agua en los respectivos puntos. Por ejemplo los puntos de muestreo que presentaban cercanía con desembocaduras de ríos o cercanía a poblados presentaban una mayor proliferación de fitoplancton, aunque no necesariamente se observaban todas las especies en cada uno de los puntos, por ejemplo hay cepas de microalgas que solo se observaron en ciertos puntos de muestreo, esta información se puede apreciar mejor en las tablas comparativas y graficas que muestran la abundancia relativa de cada una de ellas en cada uno de los puntos muestreados. Incrementos en los niveles de Nitratos y Fosfatos, se traducen en condiciones ideales para el afloramiento de microalgas. Es por eso que también se encontró variación en la cantidad de microalgas cuantificadas en muestreos realizados en época seca y época lluviosa. Debido a que las lluvias arrastran nutrientes que enriquecen las aguas del litoral Atlántico. Es por esta razón que se cuantificaron un mayor numero de microalgas en los muestreos que se realizaron en el mes de Julio. Comparado con los muestreos del mes de Febrero.

Como se puede apreciar en la grafica 1 no todas las microalgas se encontraron en todos los puntos de muestreo, por lo menos ***Bacteriastrum furcatum***, ***Chaetoceros decipiens***, y ***Synechococcus sp*** fueron las microalgas mas

abundantes, al menos en los puntos muestreados, seguidos por *Rhizosolenia sp*, *Scenedesmus sp*, *Navicula sp*, *Melosira nummuloides*, *Ceratium furca* y *Ceratium tripos*. Vale la pena mencionar que una de las cepas más interesantes que se encontraron es la *Botryococcus braunii* por su alto contenido de lípidos y su importancia en el área de los biocombustibles, lamentablemente no es un alga de crecimiento rápido, ya que en condiciones de laboratorio se logró desarrollar biomasa pero en pequeñas cantidades, suficientes al menos para realizar pruebas de porcentaje de lípidos. El resto de las microalgas se encuentran algunas con mayor frecuencia en puntos alejados de desembocadura de ríos, porque sus requerimientos básicos son aguas con un alto grado de salinidad. Se lograron observar microalgas que no necesariamente son de crecimiento en agua de mar, pero por la cercanía de cuerpos de agua dulce éstas se mezclan en un punto intermedio entre el océano y el río tal es el caso de los puntos 6,10, 11 y 14, es importante mencionar que los parámetros fisicoquímicos de estos puntos principalmente la salinidad, conductividad y pH son muy variables comparados con el resto de puntos considerados.

4.2 Análisis de los factores de cultivo de microalgas:

En este punto se presenta un análisis individual de cada uno de los factores involucrados en el cultivo de microalgas, en los cuales se describe las observaciones y conclusiones del trabajo experimental.

4.2.1 Efecto de la luz:

Se logra observar que los muestreos realizados en los meses de Febrero a Abril se presenta una mayor abundancia en todas las especies de microalgas observadas, aisladas e identificadas (con algunas excepciones), esto se debe a que en esta época del año la cantidad de luz que irradia los espejos de agua es mayor, ya que existen cielos despejados, esto por supuesto no se cumple cuando la concentración de nutrientes en el agua es muy baja, así que ambos

efectos están íntimamente relacionados. Se observó que en zonas cercanas a desembocaduras de ríos y poblados las concentraciones de nitratos y fosfatos son mas elevadas. Por lo tanto en estos puntos los afloramientos de microalgas son mas comunes, y esto se refleja en los conteos realizados in situ.

4.2.2 Efecto de la temperatura:

Las temperaturas que se registraron en los diferentes puntos de muestreo realizados no muestran variaciones muy marcadas por lo que se asume que este parámetro no se puede considerar determinante en la presencia ausencia de las especies estudiadas. Aunque se tiene conocimiento de que a bajas temperaturas la concentración de nutrientes es mayor y consecuentemente el desarrollo de biomasa tiende a incrementarse. Es importante mencionar que muchas especies de microalgas son susceptibles a los cambios de temperatura, por lo que no es de extrañar que algunas de las especies que se encontraron en la época seca no se reporten en los muestreos realizados en la época lluviosa.

4.2.3 Efecto de los nutrientes:

Un parámetro que influye considerablemente en el desarrollo de biomasa de las microalgas es la concentración de nutrientes en el agua, entre ellos están compuestos inorgánicos (nitrogenados, fosforados con hierro y sílice, etc.) esenciales para su crecimiento. En los medios de cultivo que se trabajaron para esta tesis, se incluyen sales que contienen a estos elementos. Además de vitaminas, las cuales no se encuentran presentes en cantidades considerables en aguas abiertas, pero contribuyen grandemente al desarrollo de las mismas, así que se incluyeron en los medios de cultivo empleados. A pesar de que lo prescrito en la literatura, la ausencia de vitaminas no limita el crecimiento de las microalgas. A diferencia de las vitaminas se observó que la concentración de nitratos en los diferentes puntos de muestreo si están íntimamente relacionados con la cantidad de biomasa observada en cada punto. Los nitratos son

compuestos que se encuentran en cantidades muy pequeñas en el océano, es por eso que los afloramientos de microalgas son más comunes en los litorales que mar adentro. Por otro lado las concentraciones de fosfatos en la mayoría de los puntos de muestreo se encontró que guardan una relación con la cantidad de biomasa presente. Y según la literatura es uno de los nutrientes que puede limitar significativamente el crecimiento de microalgas. En el caso de los silicatos no se realizaron lecturas en los puntos de muestreo porque no se disponía de una sonda que pudiera medirlo. A pesar de que los silicatos son empleados en la formación de la estructura celular de las diatomeas y silicoflagelados, usualmente la concentración de silicatos en los océanos supera por mucho la de nitratos y fosfatos.

Se puede observar en las tablas de resultados los valores de nitratos y fosfatos en época lluviosa, los cuales son significativamente mayores producto del lavado de nutrientes superficiales que se encuentran en el suelo, producto muchas veces de la sobre utilización de fertilizantes para cultivos extensivos y muy comunes en el departamento de Izabal. Estos son arrastrados por las corrientes de los ríos que desembocan en el mar. La composición de fitoplancton se ve afectada grandemente por la concentración de estos nutrientes en el agua, ya que las diferentes cepas tienen requerimientos específicos necesarios para su desarrollo. Esta es una de las razones por las que no fue posible encontrar a todas las cepas en todos los puntos muestreados. Se observó que clorofitas y cianobacterias forman densas poblaciones en puntos en los que las concentraciones de nutrientes son elevadas.

4.2.4 Efecto de la salinidad:

En el caso particular de la biosíntesis de lípidos se puede afirmar que al ser los lípidos metabolitos secundarios producidos por las microalgas, estos tienden a acumularse con mayor intensidad debido a factores como el estrés, deficiencia

de nutrientes, temperatura, luz y salinidad son desfavorables. Por lo que un aumento o disminución en el grado de salinidad del medio de cultivo se traduce en estrés para la microalga y se acumula lípidos en el interior de la célula con fines de reserva energética. Por lo que es importante considerar estos factores para futuros estudios en los que se considere la explotación de estos recursos así como la optimización en la extracción de metabolitos secundarios.

4.2.5 El inóculo:

La totalidad de los inóculos empleados en la producción de biomasa en este trabajo, provienen exclusivamente de los aislamientos realizados in-situ, no se compro ninguna cepa fuera del país. Vale la pena mencionar que no todas las cepas identificadas y purificadas desarrollaron biomasa de forma masiva, ya que se empleo un solo medio de cultivo para todas ellas, y seguramente este medio no cuenta con los requerimientos específicos de composición química “mínimos” necesarios para el desarrollo individual de cada cepa.

4.2.6 Fotobiorreactores:

El proceso de desarrollo de biomasa requiere del uso de varios “contenedores” de diferentes tamaños y características. Se puede decir que en una primera etapa después de la purificación de la cepa se procede a inocular las cepas en tubos de ensayo con medio liquido enriquecido. Después de observar un crecimiento adecuado en tubo de ensayo se inocular esta biomasa en recipientes de vidrio de un litro a los que se les incorpora aireación controlada por medio de bombas eléctricas acopladas a un regulador de tiempo. Algunas de las cepas se lograron desarrollar bajo estas condiciones sin ningún problema, pero la mayoría no, factores como la aireación permanente, variación del pH, concentración de macro y micronutrientes, la fragilidad de la estructura física de cada microalga, la cantidad y el tiempo de exposición a la iluminación artificial a la que estuvieron sometidas las cepas, la competencia de las microalgas con otros microorganismos por los nutrientes, etc.,... podrían ser

algunos de los factores que no permiten el desarrollo de la totalidad de las cepas.

Los materiales de mayor uso en este trabajo incluyen el vidrio y plástico transparente, por la necesidad de que la luz irradie en su totalidad el interior del medio de cultivo, debido a que la luz es necesaria para que se realicen las reacciones de fotosíntesis en las microalgas. En los anexos se incluyen fotografías de los diferentes tipos de fotobiorreactores empleados, de los cuales dos fueron diseñados exclusivamente durante la realización de la parte experimental en este trabajo de tesis. La mayoría de los cuales eran cerrados para evitar la contaminación externa.

4.2.7 Medios de cultivo:

No todas las algas tienen los mismos requerimientos nutricionales, pero para fines prácticos se emplearon medios de cultivo estandarizados. En la metodología se incluyen las formulaciones empleadas. Por otro lado se trabajaron agua de mar sintética y agua de mar filtrada y esterilizada como medio de disolución de nutrientes. Obteniéndose mejores resultados en algunos casos con el agua de mar natural, se trabajó con agua de mar con la intención de proveer a los sistemas de crecimiento las condiciones similares posibles a las de su hábitat natural. Aunque algunas cepas se desarrollaron sin ningún problema en agua de mar sintética, para la que se empleo sal cruda sin refinar como materia prima principal entre otras sales, también se incluye en la metodología la formulación.

4.2.8 Desarrollo de biomasa:

Por las razones citadas anteriormente fue imposible desarrollar suficiente cantidad de biomasa de la totalidad de las cepas de microalgas aisladas e identificadas en este trabajo. Entre ellas podemos mencionar la cantidad y el tiempo de radiación suministrado a los sistemas de cultivo, la aireación para cual se emplearon bombas de uso domestico en peceras, variación del pH,

concentración de macro y micro nutrientes puesto que se empleo una formula estándar para todas las cepas, etc.,. Las condiciones anteriores definitivamente no favorecen el desarrollo de biomasa de la totalidad de las cepas, ya que cada una de ellas tiene requerimientos específicos que no se consideraron en este estudio. La falta de desarrollo de biomasa en todas las cepas es uno de los factores que limitaron la realización de pruebas de caracterización y cuantificación de metabolitos específicos de cada microalga.

4.2.9 Recolección de biomasa:

Se emplearon varios métodos con la intención de separar la biomasa del medio de cultivo “cosecha”, filtración, centrifugación, sedimentación y floculación.

En el caso de la filtración la ***Melosira nummuloides*** fue la única cepa que se pudo recolectar eficientemente con este método, la razón principal es que esta cepa esta constituida por largas cadenas de células agrupadas en forma cilíndrica, lo que permite que el papel filtro atrape casi en su totalidad la biomasa de esta cepa. El mayor inconveniente fue que la mayoría de las microalgas tenían un tamaño inferior al del poro del papel filtro y estas no se quedaban atrapadas en el mismo. En otros casos la mayoría de la biomasa quedaba atrapada dentro de los tejidos del papel filtro, haciendo imposible su extracción a ese nivel.

La sedimentación resultó ser un método efectivo pero muy lento, no todas las cepas tienen una densidad apreciable como para poder separarse del medio en un tiempo razonable.

En el caso de la centrifugación es uno de los métodos que presentó mejores resultados a nivel general, sin embargo no se conto con una centrifuga lo suficientemente grande como para trabajar con cantidades mayores de medio. Fué funcional para las cepas que casi no desarrollaron biomasa y se separo con tubos de ensayo de 15-20 ml de capacidad.

Se trató de emplear el método de floculación pero no se contaba con suficiente volumen de solución de microalgas para ensayar diferentes relaciones de medio floculante y determinar la cantidad ideal de floculante (sulfato de aluminio o cloruro férrico) por lo que los ensayos que se realizaron no lograron producir un floculo consistente. La extracción se realizó pero no con la eficiencia esperada. Posterior a la experiencia se confirmó que los medios salinos no favorecen la formación del floculo y que se necesita agregar en exceso el floculante para que se forme el mismo.

La floculación fue uno de los métodos que menos se empleó, porque se realizaron pruebas de floculación, realizando por lo menos con dos cepas de microalgas (Navicula y cartería) curvas de floculación en las que se mantenían en tubos de ensayo cantidades constantes de biomasa disuelta y se agregaba concentraciones variables de nitrato férrico seguido de fibra de celulosa. Pero al menos con las cepas mencionadas, no se logro formar un floculo lo suficientemente estable como para separarlo del medio. Posiblemente por el tamaño de la célula de las cepas elegidas.

En la extracción de aceite de microalgas se realizo en su mayoría por medio de extracción Soxlet con variación de la identidad de los solventes extractores y su relación molar.

4.2.10 Secado de biomasa:

Para el secado de biomasa se utilizó un horno a 60 grados centígrados, previo a la separación de biomasa en la que se colocaron los extractos sobre papel periódico o papel filtro, el proceso de secado resulto ser bastante lento. Y no secar en su totalidad la biomasa tenia el inconveniente de ser susceptible a contaminación por hongos. Por lo que se debía guardar en frascos limpios y secos dentro de una desecadora.

4.3 Uso potencial de las microalgas del Atlántico

Por lo menos un 35% de las microalgas identificadas en esta investigación presentan potencial para su uso en diferentes áreas de la industria. Por lo menos en la extracción de lípidos 8 cepas de las que se aislaron, purificaron, identificaron y desarrollaron biomasa, presentan cantidades considerables de lípidos, estos lípidos pueden tener usos diversos, en alimentación animal, como lubricantes, como fuente de materia prima para la elaboración de biocombustibles. En la extracción de biomoléculas de interés químico se tienen por lo menos 6 cepas, todas con moléculas diversas que aplican en diferentes campos de la industria, de las cuales se discute de manera individual mas adelante. Para la industria crianza de moluscos, camarones y peces por lo menos 2 cepas tienen potencial para ser empleadas en este campo. Para la extracción de antioxidantes, pigmentos y clorofila 4 especies están en la capacidad de generar dichos compuestos. Vitaminas podrán extraerse de 1 de las cepas estudiadas en este trabajo. Como suplemento alimenticio en humanos hay 2 cepas. En la industria cosmética se tienen 2 cepas. Para el tratamiento de aguas residuales se cuenta con por lo menos 2 cepas. En la extracción de principios activos con actividad farmacología 1 cepa. Y en la industria de colorantes se cuenta con 4 cepas.

De lo anteriormente expuesto se puede concluir que el potencial individual de cada una de las microalgas estudiadas es alto y diverso por lo que merece la pena darle continuidad a este tipo de estudios para explotar recursos de los cuales no se saca provecho alguno en la actualidad. Guatemala no cuenta con industria alguna que se dedique a la cosecha y desarrollo de biomasa de ninguna microalga a nivel industrial. A excepción de las camaroneras del país estas si cuentan con tanques de crianza de microalgas para alimentar a los camarones en algunos estadios tempranos de crecimiento.

Vale la pena mencionar que según la hipótesis planteada en esta tesis, se cumple con la utilidad y las diferentes aplicaciones que pueden presentar las distintas cepas de microalgas que se encuentran presentes en el Atlántico del país, por lo que se recomienda darle seguimiento a los estudios relacionados con el desarrollo de biomasa de microalgas

4.4 Potencial uso de microalgas según resultados experimentales

4.4.1 Extracción de aceite:

El porcentaje de aceite extraído en cada cepa se calculó en función de la cantidad de biomasa seca, utilizada en la extracción de aceite por medio de solventes en Soxhlet. En el caso de la cepa *Botryococcus braunii* fue la que presentó un mayor porcentaje de aceite. Se observó por medio del microscopio que excreta una sustancia oleosa presumiblemente lípidos, esto podría confirmar el hecho de que el proceso extractivo con solventes fuera mas efectivo, porque las otras cepas contienen en el interior de la célula los reservorios de aceite, por lo que se hace más difícil acceder a ellos. Para mejorar los porcentajes de rendimiento en la extracción muchas veces se realizan combinaciones de procesos que permiten romper la célula previamente a la extracción de lípidos por solventes. En el caso de ***Chaetoceros decipiens*** y ***Nitzschia longissima*** no se lograron extraer los lípidos a pesar de que la literatura reporta altos niveles de hidrocarburos, porque la relación de solventes no es la mas adecuada, o simplemente el aceite no está disponible para ser extraído por este método. De la cepa ***Nannochloris sp*** no se logró realizar la extracción ya que la biomasa se contaminó con un hongo, a pesar de estar seco.

4.4.2 Cuantificación de beta caroteno por espectrofotometría UV-VIS

Para estimar la concentración de betacaroteno se procedió a extraer los pigmentos mediante un solvente orgánico y agitación extenua, después de este

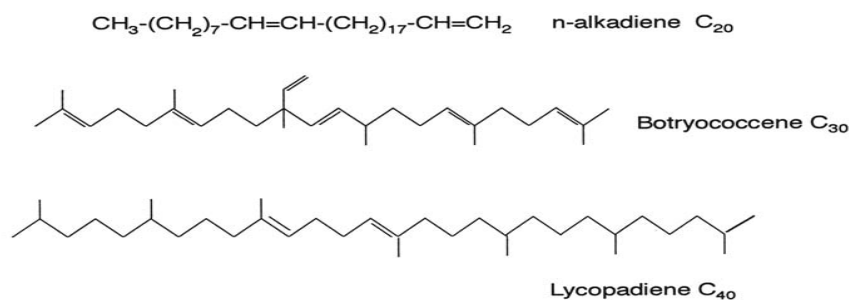
proceso se procedió a realizar lecturas en un espectrofotómetro de la longitud de onda específica para cada cepa, previo a esto se realizó una curva de calibración en la que se puede observar la relación que existe entre la absorbancia en nanómetros nm, y la concentración en mg/g de biomasa seca.

Los resultados son interesantes puesto que se observa que las cuatro cepas analizadas ***Navicula sp***, ***Clorofícea sp***, ***Nitzschia longissima*** y ***Thalasionema nitzschoides***, presentan resultados positivos en la cuantificación de betacaroteno. Por lo que se considera que presentan un alto potencial para su uso en la industria de alimentos tanto para humanos como para animales, industria de colorantes, etc.,.

4.5 Potencial uso de microalgas según consulta de literatura

4.5.1 Botryococcus braunii:

Utilizada para generar aceite de hidrocarburos para la producción de biocombustibles. Fuente de diferentes hidrocarburos, entre ellos 1.4% de petróleo de Sumatra, y un 70% está compuesto por los siguientes compuestos n-alcadieno C₂₀, botriococeno C₃₀, licopadieno C₄₀; las estructuras se muestran a continuación. crecimientos desmedidos de esta microalga están involucrados en la muerte de peces.



Fuente: Cohen, Z 1999 Chemicals from microalgae

4.5.2 *Ceratium furca*:

Por ingesta puede producir hiperxia y anoxia, Productora de mareas rojas junto con otros dinoflagelados.

Tomas C. 1997. Identifying marine phytoplankton. Academic Press. New York. 858 p

4.5.3 *Ceratium fusus*:

Contienen una molécula responsable de la bioluminiscencia que es la luciferina, la cual es oxidada por la enzima luciferaza, resultando de esta acción es la emisión de luz.

4.5.4 *Ceratium trichoceros*:

Pueden adaptarse fácilmente a ambientes en los cuales las concentraciones de nitrógeno y fosforo son elevados.

4.5.6 *Chaetoceros* sp:

Se utiliza como alimento en cultivos de rotíferos, almejas, ostiones y larvas de camarón.

Manual de la producción y uso de alimento vivo para acuicultura, Universidad de Ghent, Bélgica FAO

4.5.6 *Chlamydomonas reinhardtii*:

Este organismo ha sido particularmente utilizado para la disección de la fotosíntesis.

4.5.7 Clorofíceas

Contienen clorofila, lo que les permite sintetizar sustancias alimenticias a partir de materias minerales, adicionalmente tienen carotenoides como la luteína. Los alimentos sobrantes los almacenan en forma de almidón.

Lee, Robert E. Phycology. Cambridge University Press 2008- 547 páginas. 4 edición. 2008

4.5.8 Diatomea verde:

Producción de vitamina B-12

4.5.9 *Microsystis* sp:

Este genero es capaz de generar por lo menos dos neurotoxinas que son la anatoxina y la saxitoxina. Capaces de bloquear la transmisión de las señales eléctricas entre neuronas.

4.5.10 *Navicula* sp:

Extracción de pigmentos fotosintéticos como: clorofila c1, c2 y c3; carotenos, fucoxantina, diatoxantinas, carotenoides.

Stauber Jennifer L S.W. Jeffrey Photosynthetic pigments in fifty-one species of marine diatoms

4.5.11 *Nitzschia longissima*

Extracción de pigmentos fotosintéticos como: clorofila c1, c2 y c3; carotenos, fucoxantina, diatoxantinas, carotenoides. Produce una toxina llamada ácido domoico. El ácido domoico es una neurotoxina que causa la intoxicación amnésica de molusco, llamado así por sus efectos sobre la memoria a corto plazo.

Stauber Jennifer L S.W. Jeffrey Photosynthetic pigments in fifty-one species of marine diatoms;

4.5.12 *Odontella aurita*:

Es utilizada en la elaboración de productos como sopas, galletas y diversos productos de pesca. Su rango de aplicaciones se ve limitada por el hecho de ser muy saborizada. Sin embargo, se considera que también podría ser

presentado como un suplemento dietético en forma de cápsulas. También es utilizado en la industria cosmética.

4.5.13 *Rhizosolenia styliformis*:

Útiles en la identificación de eutrofización de cuerpos de agua

4.5.14 *Scenedesmus* sp:

Se utiliza en el proceso de depuración de aguas residuales. Proporciona oxígeno para la descomposición bacteriana de la materia orgánica y que a su vez ayuda a eliminar otras sustancias nocivas.

4.5.15 *Thalassionema nitzschoides*:

Extracción de pigmentos fotosintéticos como: clorofila c1, c2 y c3; carotenos, fucoxantina, diatoxantinas, carotenoides.

Stauber Jennifer L S.W. Jeffrey Photosynthetic pigments in fifty-one species of marine diatoms

4.5.16 *Thalassiosira* sp:

Extracción de polisacáridos como manosa, ramnosa, fucosa, xilosa, galactosa, glucosa, ácido glucorónico y N-acetilglucosamina. Útil para producir biocombustibles en lugar de combustibles fósiles. Se ha determinado su capacidad para producir petróleo. También produce biopigmento. Biopigmento es utilizado en la industria de la comida, de medicina y en la industria cosmética. Es un colorante natural que es seguro de usar, tales como fines de consumo.

Se emplea como alimento en el crecimiento de moluscos bivalvos, Manual de la producción y uso de alimento vivo para acuicultura,

Extracción de xantofilas (aplicaciones semejantes a las de los carotenoides, como aditivos alimentarios para peces y aves para que la carne de los peces o la yema de los huevos tenga un color más intenso).

4.6 Biocombustibles:

De todas las cepas identificadas y aisladas, la que presenta un potencial en el tema de extracción de lípidos para la elaboración de biocombustibles es la ***Botryococcus braunii*** que a pesar de haberse encontrado en uno solo de los puntos de muestreo, y después de varios intentos por desarrollar biomasa, logro generar una considerable cantidad de lípidos, y lo mejor de todo es que esta microalga tiene la característica de que no acumula los lípidos en el interior de la célula, lo que favorece los procesos extractivos. En condiciones de laboratorio se logró extraer con equipo Soxhlet 40% de peso seco de aceite aunque la literatura reporta de un 29 – 75%. Otra cepa a la que se le pudo realizar extracción con solventes de lípidos es la ***Chaetoceros decipiens*** que aunque presentó un 10% de extracción tiene la ventaja de desarrollar biomasa a una velocidad mayor que la ***Botryococcus braunii***, lamentablemente no se hicieron cálculos para estimar el tiempo de producción de biomasa. Pero se consiguió aproximadamente 4 gramos de biomasa seca en un lapso de 3 meses.

4.7 Acuicultura

Las microalgas son requeridas en la nutrición larval de moluscos y camarones de forma directa e indirecta en la alimentación de peces. En este trabajo de investigación se cuenta con tres cepas que tienen el potencial de ser usadas para este propósito estas son: ***Tetraselmis***, ***Thalassiosira*** y ***Chaetoceros***. La razón por la cual son empleados es porque son fáciles de cultivar y no son tóxicas. La concentración de proteínas es el factor determinante del valor nutricional de estas cepas, además de la alta concentración de ácidos grasos insaturados como EPA Acido eicosapentaenoico, AA ácido araquidónico y DHA ácido docosahexaenoico, los cuales son esenciales para muchos animales marinos. Otra de las cepas que llama la atención es la ***Nitzschia longissima*** ya que esta cepa contiene considerable cantidad de EPA Acido eicosapentaenoico por lo que es utilizada como suplemento nutricional en acuicultura.

CONCLUSIONES

1. Los puntos de muestreo seleccionados evidencian que la biodiversidad de microalgas varía de un punto a otro en relación a la abundancia relativa de cada microalga así como también las diferentes cepas que se encuentran en él, todo esto influido principalmente por la concentración de nutrientes, temperatura, turbidez del agua, geología del lugar, dinámica de fluidos.
2. Los muestreos realizados en el mes de Julio del 2010 presentan mayores concentraciones de nutrientes, como nitratos y fosfatos en los puntos de muestreo analizados, así como también una mayor concentración de microalgas. Otros parámetros fisicoquímicos guardaron relación con lo anterior principalmente turbidez.
3. Empleando técnicas como estriado en caja de Petri y micromanipulación se lograron aislar y purificar por lo menos 13 de 43 cepas identificadas, no todas las cepas crecen bajo las mismas condiciones por ejemplo ***Botryococcus braunii*** creció sin problema en caja de Petri pero en medio líquido se dio el crecimiento pero muy lentamente.
4. Factores como la aireación permanente, variación del pH, concentración de macro y micronutrientes, la fragilidad de la estructura física de cada microalga, la cantidad y el tiempo de exposición a la iluminación artificial a la que estuvieron expuestas, la competencia de las microalgas con otros microorganismos por los nutrientes, etc. pueden ser algunos de los factores que no permitieron el desarrollo de biomasa de la totalidad de las cepas identificadas y aisladas en este trabajo.
5. Las microalgas ***Botryococcus braunii***, ***Chaetoceros decipiens***, ***Nannochloris sp***, ***Navicula sp***, ***Nitzschia longisima***, ***Scenedesmus***

sp, Tetraselmis sp y Thalassiosira sp que se aislaron, purificaron, identificaron y presentaron valores altos de lípidos se consideran como materia prima con potencial para ser empleados en la elaboración de biodiesel.

6. Las cepas de microalgas de **Navicula sp, Clorofícea sp, Nitzschia longissima y Thalasionema nitzschioides**, presentan concentraciones considerables de betacaroteno 0.25, 0.41, 0.71 y 0.76 respectivamente, presentando todas potencial uso como fuente para la extracción de betacarotenos. Lo que las convierte en potencial materia prima para la elaboración de suplementos alimenticios tanto para humanos como para animales, en la fabricación de pigmentos o colorantes naturales en la industria alimenticia o cosmética, y como antioxidantes en la industria farmacéutica.

RECOMENDACIONES

1. Realizar muestreos en los mismos puntos marcados con GPS en diferentes épocas del año, por lo menos en intervalos de dos o tres meses, para evaluar los cambios relacionados con la época seca y lluviosa en cuanto a la biodiversidad y cantidad de microalgas presentes en cada punto, así como la influencia o relación que tienen los parámetros fisicoquímicos en la abundancia relativa de las diferentes cepas de microalgas.
2. Se recomienda el uso de medios de cultivo modificados para cada una de las cepas identificadas en este trabajo, además de evaluar las condiciones óptimas de aireación, nutrición, iluminación, salinidad, temperatura, etc., para garantizar el desarrollo de biomasa de cada una de ellas. Así como el uso de antibióticos y vitaminas para fortalecer los cultivos y evitar la contaminación con otros microorganismos como hongos y bacterias.
3. El método de extracción Soxlet demostró una mayor eficiencia extractiva cuando se emplearon mezclas de metanol-cloroformo en relación 50:50 comparado con el éter etílico, cloroformo y metanol empleados de manera individual. Por lo que se recomienda para extracciones futuras mezclas extractivas de solventes en diferentes relaciones para determinar cual es la que mas se adecua al proceso.
4. Para la extracción de aceite de microalgas se sugiere el uso de equipo de extracción supercrítica de fluidos, para comparar los resultados de extracción con el método empleado, debido a que este último es un método exhaustivo y que por las características del mismo permite realizar una extracción más eficiente de aceite pues la presión y el volumen de solvente empleados sugiere un mayor contacto con la matriz y por lo tanto mayor rendimiento en el proceso extractivo. Lo mas

importante de la extracción supercrítica es el hecho de no emplear solventes contaminantes que estarían presentes en los extractos finales, y mas si se desean emplear para usos alimenticios o medicinales.

5. Para mejorar el rendimiento de la producción de lípidos en microalgas, se recomienda la variación de parámetros como la exposición a la luz, y la aireación, en este trabajo se emplearon condiciones de exposición a iluminación artificial similares en cuanto a intensidad y tiempo de exposición a las que las microalgas están habituadas en su medio natural, 12 horas de iluminación continua y 12 horas de reposo, la aireación o saturación del medio con dióxido de carbono se realizo en lapsos de 2 horas con una duración de 1 hora únicamente en el período de iluminación.

6. Socializar la información relacionada con el uso e importancia de las microalgas que son susceptibles de ser explotadas o cultivadas artificialmente para el aprovechamiento de los diferentes recursos derivados de las mismas para mejorar sustancialmente la económica del país.

7. Se pueden emplear combinaciones de técnicas para la extracción de lípidos, para mejorar los porcentajes de rendimiento.

8. Emplear análisis instrumentales mas precisos para la cuantificación de beta caroteno en los extractos de microalgas.

REFERENCIAS

1. Abalde, J.; Cid, A.; Fidalgo, P.; Torres, E. & Herrero, C. (1995). Microalgas: cultivo y aplicaciones. A Coruña, Servicio de publicaciones de la Universidad da Coruña
2. Andersen, R. 2005. Algal Culturing Technique. Elsevier. 578pp.
3. Barros, S., Cintra, R., Mancini-Filho, J. y Miranda, M. 1998. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina máxima*. Brazilian Journal of Medical and Biological research. 31: 1075-1079.
4. Ben-Amotz, A. (2004). Industrial Production of microalgal cell-mass and secondary products-major industrial species. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Richmond, A. Oxford, Blackwell Science.
5. Borowitzka, M.A. (1995). "Microalgae as sources of pharmaceutical and other biologically active compounds". Journal of Applied Phycology 7: 3-15.
6. Borowitzka, M.A. (1999). Pharmaceuticals and agrochemicals from microalgae. Chemicals from microalgae. Cohen, Z. London, UK, Taylor & Francis: 313-352.
7. Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (1988). Micro-algal biotechnology. Cambridge, Cambridge University Press
8. Brown, M.R. (1991). "The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture". Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 145(1): 79-99.
9. Brown, M.R.; Jeffrey, S.W.; Volkman, J.K. & Dunstan, G.A. (1997). "Nutritional properties of microalgae for mariculture". Aquaculture 151(1-4): 315-331.

10. Catchpole, O.J.; Grey, J.B.; Mackenzie, A.D. & Tallon, S.J. (2007). "Extraction of highly unsaturated lipids with liquid dimethyl ether". New Zealand, Patente: WO2007136281.
11. Chidambara M, K.N.; Vanitha, A.; Rajesha, J.; Swamy Mahadeva, M.; Sowmya, P.R. & Ravishankar, G.A. (2005). "In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina* -- a green microalga". *Life Sciences* 76(12):1381-1390.
12. Chisti, Y (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294-306.
13. Choi, K.J.; Nakhost, Z.; Krukonis, V.J. & Karel, M. (1987). "Supercritical fluid extraction and characterization of lipids from algae *Scenedemus obliquus*". *Food Biotechnology* 1: 263-270.
14. Cohen, Z. (1999). *Chemicals from microalgae*. London, Taylor & Francis
15. CONAP. 2008. *Guatemala y su Biodiversidad: un enfoque histórico, cultural, biológico, y económico*. Consejo nacional de áreas protegidas, oficina técnica de Biodiversidad. Guatemala. 650 p.
16. Estrada, E. 2009, Fodecyt 03-2009 Evaluación del cultivo de microalgas a nivel de planta piloto para la extracción de aceite como materia prima en la producción de biodiesel. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
17. Estrada, E. 2008. Fodecyt 43-2007 Determinación de aceites en algas marinas como potencial materia prima para la producción de biodiesel. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.

18. Fonseca, A. C. y Arrivillaga, A. 2003. Coral reefs of Guatemala, En: Cortéz, J. (ed) Latin American Coral Reefs. Elsevier Science B.V. Amsterdam. 508p.
19. Guil-Guerrero, J.L.; Belarbi, E.H. & Reboloso Fuentes, M.M. (2000). "Eicosapentaenoic and arachidonic acids purification from the red microalga *Porphyridium cruentum*". Bioseparations 9: 299-304.
20. Herrero, M.; Cifuentes, A. & Ibanez, E. (2006). "Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review". Food Chemistry 98(1): 136-148.
21. Ho TY, Quigg A, Finkel ZV, Milligan AJ, Wyman K, Falkowski PG, Morel FMM (2003) The elemental composition of some marine phytoplankton. J Phycol 39:1145–1159
22. Jeffrey, S.W., Mantoura, F.F.C. & Wright, S.W. (1997). Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods. Paris, UNESCO Publishing.
23. Kreitlow, S., Mundt, S. & Lindequist, U. (1999). "Cyanobacteria: a potential source of new biologically active substances". Journal of Biotechnology 70: 61-63.
24. Le Totour, B. (1990). " Antioxidative activities of algal extract, synergistic effect with vitamine E". Phytochemistry 29(12): 3759-3765.
25. Leiva, X. 2006. Informe de Tesis de Biología. Pastos marinos: composición comunitaria, biomasa de pastos marinos y morfometría de *Thalassia testudinum*, en dos sitios de Bahía La Graciosa, Izabal, Guatemala. Facultad de Ciencias y Humanidades. Universidad del Valle de Guatemala.

26. Mendes, R.L., Nobre, B.P., Cardoso, M.T., Pereira, A.P. & Palavra, A.F. (2003). "Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae". *Inorganica Chimica Acta* 356: 328-334.

27. Mendes, R.L.; Fernandes, H.L.; Coelho, J.P.; Reis, E.C.; Cabral, J.M.S.; Novais, J.M. & Palavra, A.F.(1995). "Supercritical CO₂ extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris*". *Food Chemistry* 53(1): 99-103.

28. Mendiola de León, J. 2008. Extracción de compuestos bioactivos de microalgas mediante fluidos supercríticos. Facultad de ciencias. Departamento de Química-Física aplicada. Universidad Autónoma de Madrid. España. 147pp.

29. Morris H, Quintana Maria, Almarales Angel, Hernanadez Lisethy Composicion bioquimica y evaluacion de la calidad proteica de la biomasa autotrofica de *chlorella vulgaris*. Centro de investigaciones de energia solar. Santiago de Cuba.

30. PREPAC, (plan regional de pesca y acuicultura regional). 2005. Inventario de cuerpos de agua de Guatemala con énfasis en la pesca y acuicultura. Guatemala: OSPESCA-MAGA-OIRSA. 878p.

31. Robles M, A.; Molina Grima, E.; Giménez Giménez, A. & Ibáñez González, M.J. (1998). "Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids". *Biotechnology Advances* 16(3): 517-580.

32. Salazar, M. 2005. Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. Laboratorio de microbiología ambiental y tratamiento de aguas residuales. depto. de biotecnología. UAM-I.

33. Salazar, Margarita. 2005. Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. Laboratorio de microbiología ambiental y tratamiento de aguas residuales. depto. de biotecnología. UAM-I.
34. Tokio, I.; Nobuyuki, S.; Kenichi, U. & Daizo, T. (1994). "Process for separating docosahexaenoic acid or Esther thereof from marine microalgae". Jap.n, Patente: WO9421766.
35. Van den Hoek, C.; Mann, D.G. & Jahns, H.M. (1995). Algae. An introduction to phycology. Cambridge, Cambridge University Press
36. Whitfield, F.B., Helidoniotis, F., Shaw, K.J. & Svoronos, D. (1999). "Distribution of bromophenols in species of marine algae from eastern Australia". Journal of Agricultural and Food Chemistry 47: 2367-2373.
37. Yamaguchi, K.; Yamamoto, H.; Ando, N.; Murai, K. & Kajiyama, T. (1985). "Production of lipid containing carotinoids from algae". (Iwatani & Co.) Jap.n, Patente: JP60207567

APENDICE

Links de consulta

URL mapa puntos de muestreo	https://mapsengine.google.com/map/edit?mid=zR0a071Nd2il.klOAKy2p3xmk
Articulo relacionado con el estudio de Botryococcus braunii	http://blogdelaboratorio.com/tag/botryococcus-braunii/
Documento de microalgas	http://ebme.marine.rutgers.edu/html_docs/pub.html
Estudio de Chlamydomonas reinhardtii	http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1529-8817.1998.340907.x/abstract
Articulo que estudia los usos de Odontella aurita	www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/acnfp593.pdf
Informacion de Scenedesmus sp	http://rmbr.nus.edu.sg/dna/organisms/details/652

Articulo de	http://www.itb.ac.id/en/news/3807.xhtml
Thalasiosira sp	

Tipos de fotobiorreactores

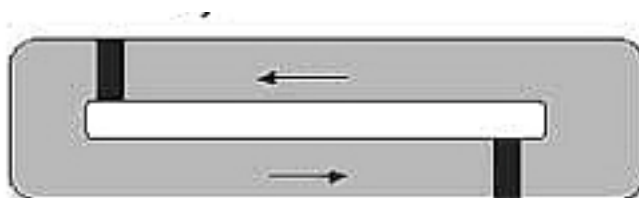


Figura 1. Fotobiorreactor de tubo circular

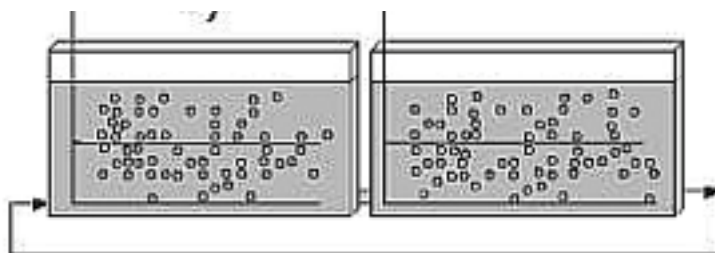


Figura 2. Fotobiorreactor de pecera plana

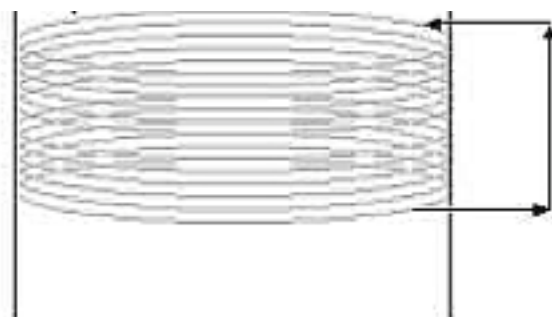


Figura 3. Fotobiorreactor de espiral

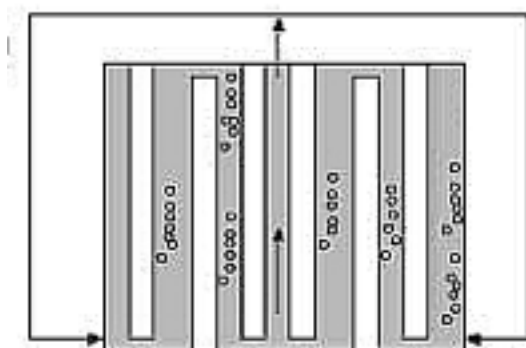


Figura 4. Fotobiorreactor de tubo vertical

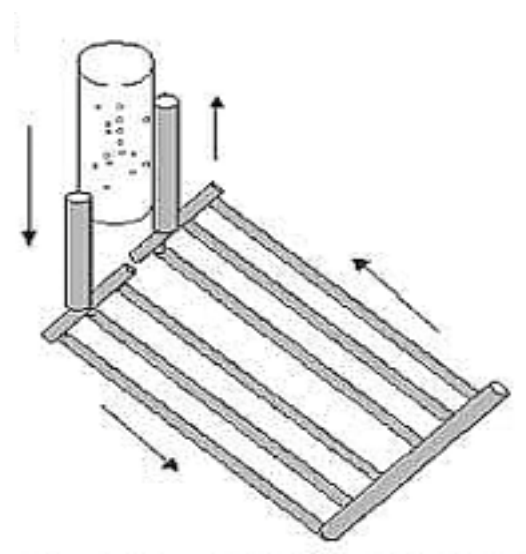


Figura 5. Fotobiorreactor de tubo inclinado